

miRNA 提取试剂盒

E.Z.N.A.[®] miRNA Kit

货号	R6842-00	R6842-01	R6842-02
反应次数	5 次	50 次	200 次
MicroElute [®] RNA Columns	5 个	50 个	200 个
HiBind [®] RNA Mini Columns	5 个	50 个	200 个
2 mL Collection Tubes	15 个	150 个	600 个
RNA-Solv [®] Reagent	6 mL	60 mL	220 mL
RWC Wash Buffer	5 mL	40 mL	160 mL
RWB Wash Buffer	4 mL	2 x 12 mL	2 x 50 mL
Nuclease-free Water	5 mL	20 mL	60 mL
User Manual	✓	✓	✓

★ 保存方式及稳定性

- 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输；RNA-Solv[®] Reagent 长期保存需要放置 2-8°C。
- 本试剂盒仅限科学研究使用。

★ 实验前准备

- 按照下表提示，使用【无水乙醇】对 RWB Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存；

货号	无水乙醇 加入量
R6842-00	16 mL
R6842-01	48 mL (每瓶)
R6842-02	200 mL (每瓶)

- (可选) 每毫升 RNA-Solv[®] Reagent 需加入 20 μ L 2-巯基乙醇，该混合液可室温贮存两周。

★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 离心转速可达 12,000xg 的小型低温离心机
- ✓ 无酶吸头及 1.5mL 离心管
- ✓ 氯仿、无水乙醇、70%乙醇（由无酶水配置）
- ✓ 匀浆工具（如针管针头、研磨棒、玻璃珠、自动匀浆仪任一种）
- ✓ （可选）14.3M 2-巯基乙醇、DNase I 消化套装

★ 组织匀浆

A. 液氮研磨方法

1. 使用液氮时，佩戴合适的手套，小心操作。
2. 切下组织并加入少量液氮迅速冷冻。
3. 用陶瓷研钵加大约 10 mL 的液氮中研磨组织样品；
4. 将研磨好的悬浮液倒进 2mL 或 15 mL 离心管中；
注意：离心管需要提前遇冷，否则样品悬浮液会在管内剧烈沸腾冒出，可能会导致组织损失。
5. 让液氮完全蒸发，并加入 RNA-Solv[®] Reagent 进行裂解

B. 角转子均质仪：样品裂解和均质化

使用角转子均质仪对样品进行裂解和均质化，可以处理大多数的样品。这个过程通常需要时间少于 1min，具体根据不同的样品类型决定。许多均质仪使用不同大小的马达和研磨探头，可以在小离心管内进行。

C. 注射针筒：样品裂解和均质化

高分子量的 DNA 会增加细胞裂解液的粘稠度，使用窄针头（19-21 规格）反复吸打 10-20 次可以让样品切碎。

★ 提取步骤 A: 提取细胞或组织样品 miRNA

1. 1mL RNA-Solv[®] Reagent 可有效裂解的细胞数为 1×10^7 , 30-50mg 动物组织或 50-100mg 植组织, 按照以下方法裂解样品。
 - ✓ 悬浮培养细胞:
在 1500rpm (或 400xg) 离心 5min 收集细胞, 弃去上清培养液; 加入 1 mL RNA-Solv[®] Reagent, 枪头吹打裂解细胞直至完全裂解, 然后转移到 1.5mL 无酶离心管中; 接第 2 步继续操作。
 - ✓ 贴壁培养细胞:
弃除培养基, 加入 1 mL RNA-Solv[®] Reagent, 枪头吹打裂解细胞直至完全裂解, 然后转移到 1.5mL 无酶离心管中; 接第 2 步继续操作。
 - ✓ 组织:
按照第 2 页组织匀浆的方法对组织样品进行研磨, 然后加入 1 mL RNA-Solv[®] Reagent 裂解组织。接第 2 步继续操作。
2. 室温放置 2-3min。
3. 加入 200 μ L 氯仿, 高速涡旋 15s 充分混匀。冰浴 10min。
4. 4 $^{\circ}$ C 最大速度 (> 12,000xg) 离心 15min 分离上层水相以及有机相, 转移上层水相到一新的 2 mL 离心管中。
5. 加入 0.5 倍上清体积的无水乙醇, 涡旋彻底混匀 (如果样品是肝脏或脾脏等 RNA 丰度高的样品, 则加入 1/3 体积的无水乙醇);
6. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套入收集管中, 转移第 5 步得到的混合液到结合柱中 (每次转移的混合液 $\leq 700\mu$ L), 室温 10, 000xg 离心 1min, 将滤液转移到 2mL 无酶离心管中;
7. 重复步骤 6, 直至第 5 步得到的所有混合液都通过 HiBind[®] RNA Mini Column;
注意: HiBind[®] RNA Mini Column 结合了 > 200nt 的大分子 RNA, 按照提取步骤 B 操作可以得到大分子 RNA。

miRNA 的纯化 (< 200nt)

8. 将步骤 6 和 7 的滤液合并在一起并测量体积, 加入 0.9 倍滤液体积的无水乙醇到滤液中, 涡旋混匀。

9. 将 MicroElute[®] RNA Column 套入 2 mL 收集管中，转移步骤 8 的混合液到柱子中，室温 10,000xg 离心 1min，弃滤液。
10. 重复步骤 9 直至把步骤 8 所有混合液都通过 MicroElute[®] RNA Column。
11. 将 MicroElute[®] RNA Column 套回收集管中，加入 500 μ L RWB Wash Buffer（已加无水乙醇正确稀释）至结合柱中，10,000xg 离心 1min，弃滤液；
注意：RWB Wash Buffer 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。
12. 重复步骤 11；
13. 将 MicroElute[®] RNA Column 套回收集管中，13,000xg 离心空甩 2min。
14. 将 MicroElute[®] RNA Column 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 15-30 μ L Nuclease-free Water 至结合柱中，10,000xg 离心 2min 洗脱 RNA，产物放置-70 $^{\circ}$ C 保存。

注意：以下操作可能帮助提高 RNA 产量：

- 使用前将 Nuclease-free Water 70 $^{\circ}$ C 预热；
- 室温静置 5min；
- 增加洗脱液的体积；
- 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）
- 将第一次洗脱出的 Nuclease-free Water 重新加回到柱子中进行二次洗脱（可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积）

★ 提取步骤 B：从 HiBind[®] RNA Mini Column 中纯化大分子 RNA

1. 按照提取步骤 A 里的步骤 1-7 进行操作。
2. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套入新的收集管中。

可选 DNase I 消化步骤（需另购 DNase I Set 货号 E1091）

如需使用 DNase I 对 DNA 污染进行消解，请参考第 6 页“DNase I 消化步骤”。
如无需进行 DNA 消解，请接着按第 3 步操作；

3. 加入 500 μ L RWC Wash Buffer 至结合柱中, 10,000 \times g 离心 30s, 弃滤液;
4. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套回收集管中, 加入 500 μ L RWB Wash Buffer (已加无水乙醇正确稀释) 至结合柱中, 10,000 \times g 离心 1min, 弃滤液;
注意: RWB Wash Buffer 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。
5. 重复步骤 4;
6. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套回收集管中, 10,000 \times g 离心空甩 2min。
7. 将 HiBind RNA Mini Column 套入新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-50 μ L Nuclease-free Water 至结合柱中, 10,000 \times g 离心 2min 洗脱 RNA, 产物放置-70 $^{\circ}$ C 保存。
注意: 以下操作可能帮助提高 RNA 产量:
 - 使用前将 Nuclease-free Water 70 $^{\circ}$ C 预热;
 - 室温静置 5min;
 - 增加洗脱液的体积;
 - 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱 (可增加产量, 但会导致浓度降低)

★ 提取步骤 C —— 总 RNA 提取 (包含大分子和小分子 RNA)

1. 按照提取步骤 A 里的第 1-4 步进行操作。
2. 往滤液中加入 1.5 倍体积的无水乙醇, 涡旋彻底混匀。
3. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套入收集管中, 转移第 2 步得到的混合液到结合柱中 (每次转移的混合液 \leq 700 μ L), 室温 10, 000 \times g 离心 1min, 将滤液转移到 2mL 无酶离心管中;
4. 重复步骤 3, 直至所有混合液都通过 HiBind[®] RNA Mini Column。
5. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套至收集管中, 加入 500 μ L RWB Wash Buffer (已加无水乙醇正确稀释) 至结合柱中, 10,000 \times g 离心 1min, 弃滤液;
注意: RWB Wash Buffer 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。
6. 重复步骤 3;
7. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套回收集管中, 10,000 \times g 离心空甩 2min。

8. 将 HiBind® RNA Mini Column 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 40-50 μ L Nuclease-free Water 至结合柱中，10,000xg 离心 2min 洗脱 RNA，产物放置 -70°C 保存。

注意：以下操作可能帮助提高 RNA 产量：

- 使用前将 Nuclease-free Water 70°C 预热；
- 室温静置 5min；
- 增加洗脱液的体积；
- 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）

★ DNase I 消化步骤（可选步骤）

用户自备试剂： DNase I Digestion Set (货号 E1091)

按照上述提取步骤 B 完成 1-2 步后，请按以下步骤操作：

1. 每一个 HiBind® RNA Mini Column，按照按下表配置 DNase I 溶液：

溶液名称	每份配量
Digestion Buffer	73.5 μ L
RNase-Free DNase I	1.5 μ L
总量	75 μ L

重要提示：

- ✓ DNase I 非常敏感且易发生物理变性，切勿大力涡旋 DNase I 溶液。建议轻柔颠倒离心管进行混匀；
 - ✓ DNase I 混合液需现配现用；
 - ✓ 请使用套装内配套的 Digestion Buffer 消化液，其他消化液与膜上消化操作不配套，可能会降低 RNA 产量及纯度；
 - ✓ 全部操作均在室温下进行，请谨慎且尽量快速地操作。
2. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套入 2ml 收集管中，往 HiBind® RNA Mini Column 加入 300 μ L RWC Wash Buffer，10,000 \times g 室温离心 1min，弃掉滤

液;

3. 将配置好的 75 μ L 的 DNase I 溶液, 转移至 HiBind[®] RNA Mini Column 膜的正中央, 切勿打到结合柱壁;
4. 室温静置 15min;
5. 加入 500 μ L RWC Wash Buffer 至 HiBind[®] RNA Mini Column 中, 室温静置 2min, 10,000 \times g 离心 1min, 弃滤液;
6. 按照步骤 C 的第 5-8 步完成操作。

★ 产品信息卡



更多详情, 请扫描左方二维码获取原文说明书

中文翻译仅供辅助阅读



常见问题合集及操作注意事项

请扫描左方二维码获取



中国总代理: 广州飞扬生物工程有限公司

技术支持: 020-32051125

企业 QQ: 800848200 (人工客服在线)

中文网站: **omegabiotek.com.cn**

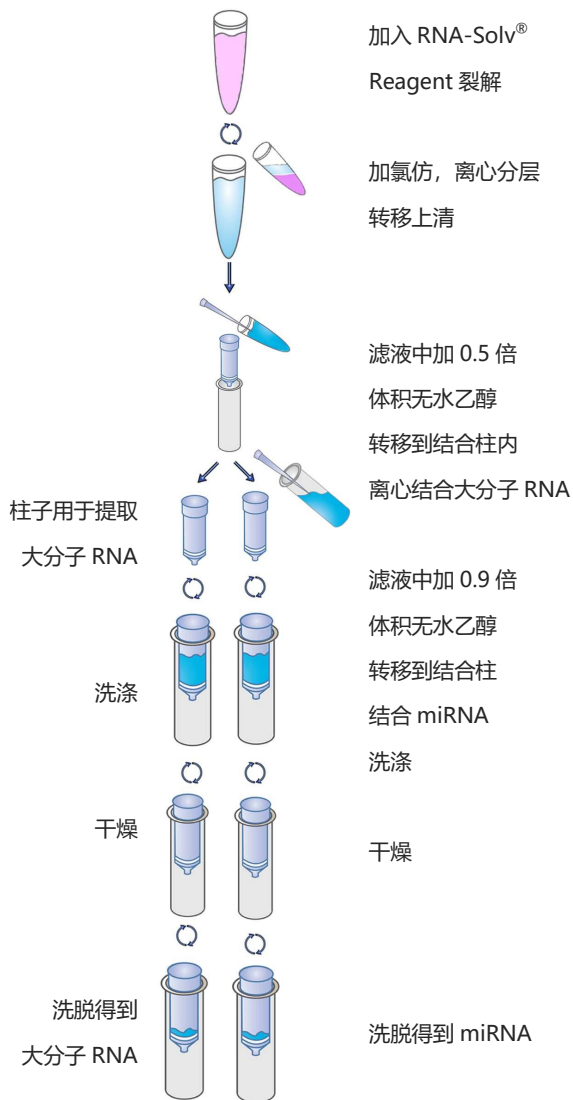
如需查询代理商名录, 请关注“飞扬生物”微信号获取

售后保障服务说明

为确保您所使用的试剂为正品来源, 请从使用单位所在地指定代理商处购买 Omega bio-tek 产品。由其他渠道购买或任一标签信息(应包括货号、条形码、完整 Lot 号、失效日期)缺失的试剂盒, 我司恕不提供任何质量保证及售后服务。

★ 提取步骤示意图

分开提取 miRNA 和大分子 RNA 操作流程



提取总 RNA 操作流程

