

MiPure Cell/Tissue miRNA Kit
(离心柱型)

RC201



Vazyme Biotech Co., Ltd

Web: www.vazyme.com
Tel: 400-600-9335
Sales: sales@vazyme.com
Support: support@vazyme.com
Service: service@vazyme.com



企业已通过 ISO 9001:2015
国际质量管理体系认证



www.vazyme.com
Vazyme biotech co., Ltd.

使用说明书
Version 7.1

目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/自备材料	02
05/注意事项	03
06/实验方案概览	04
07/实验方案	05
07-1/细胞小分子RNA的提取	06
07-2/动物组织小分子RNA的提取	07
07-3/大分子RNA的提取	08
07-4/总RNA提取(含大分子、小分子RNA)	09
08/常见问题与解决方案	10

01/产品概述

MiPure Cell / Tissue miRNA Kit适用于从少于 5×10^6 个真核细胞或少于100 mg动物组织中提取小分子RNA(miRNA, <200 nt), 得到的miRNA纯度高, 没有大分子RNA或基因组DNA的污染, 可直接用于芯片分析、Northern杂交、RT-PCR及miRNA文库构建等。本试剂盒结合高效的RNA Isolater抽提试剂和硅胶柱纯化技术, 可在1小时内完成miRNA的提取; 也可用于分离提取大分子RNA(>200 nt)或总RNA(含miRNA), 满足用户的不同需求。

02/产品组分

组分		RC201 (50 rxn)
Box 1	RNA Isolater	60 ml
	Buffer miRW1	30 ml
	Buffer miRW2	20 ml
Box 2	RNase-free ddH ₂ O	30 ml
	MiPure RNAspin Column	50 个
	MiPure miRNA Column	50 个
	2 ml Collection Tube	100 个

03/保存条件

Box 1: 4°C避光保存

Box 2: 室温保存

04/自备材料

无水乙醇; 三氯甲烷(氯仿); 使用RNase-free ddH₂O新鲜配制80%乙醇(每个样品需要500 μl); 1.5 ml的RNase-free离心管; RNase-free枪头; 小型离心机; ~12,000 g的低温离心机; 合适的匀浆工具;

首次使用时, 按下表在Buffer miRW1、Buffer miRW2中加入无水乙醇, 并于室温保存。

试剂名称	Buffer miRW1	Buffer miRW2
加入无水乙醇的量 (ml)	60	80

05/注意事项

- ◇ 本制品的裂解液RNA Isolater中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会导致中毒、灼伤以及其他身体伤害。使用本制品时应穿戴防护物品，如防护服、手套、眼罩、面罩等。
- ◇ 所有操作步骤，如果没有特别指出，均在常温条件下(15~25℃)进行。
- ◇ RNA得率和质量与组织样本用量和洗脱体积有关，建议每1 ml RNA Isolater 裂解10~100 mg 组织，或不多于 5×10^6 个细胞。洗脱体积应不少于30 μ l，否则会影响RNA的得率。
- ◇ 使用本试剂盒时，请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩等，最大程度的避免RNase 污染。
- ◇ 样本的选择及保存会很大程度上影响RNA的产量以及质量。应尽可能的采用新鲜的动物组织或细胞进行RNA提取。如果采集的样本暂不提取RNA，可以将新采集的样本立即置于液氮中速冻后于-70℃保存，并且避免反复冻融，或者将样本立即置于RNA Isolater裂解液中匀浆后，置于-70℃保存。为了避免RNA的降解，样本的采集与保存应尽可能迅速地进行。
- ◇ 样本破碎需彻底，完全破坏细胞膜及细胞器以释放RNA，破碎不充分将影响RNA的产量，匀浆时尽量低温，防止因匀浆过程中产生的热量导致RNA降解。
- ◇ RNA在RNA Isolater中不会被RNase污染，但裂解后处理过程应保证RNase-free环境。
- ◇ 本试剂盒可去除体系中基因组DNA，纯化获得的RNA通常无需使用DNase处理即可用于下游实验操作。如果下游实验对痕量的DNA十分敏感，可以选用商业化RNase-free DNase彻底清除。

06/实验方案概览



07/实验方案

实验准备

RNA提取的关键在于防止RNase污染。RNase在环境中普遍存在，且极为稳定，痕量RNase即可迅速降解RNA，因此，需要从如下几方面做好防护措施：

1. 戴一次性干净手套；在单独洁净的区域操作；戴口罩并在操作过程中避免讲话。通过以上办法可有效防止实验者汗液、唾液中的RNase污染。
2. 使用RNase-free的实验器具，包括枪头和离心管。RNA实验所用器具应专门使用，不可用于其它实验。
3. RNA实验所用试剂都应专用，避免混用后造成交叉污染。RNase-free ddH₂O建议分装后保存。

样品的处理

样品的均质化处理是所有RNA提取所必需的步骤。通过吹打或匀浆让细胞或组织块快速分散、细胞壁和细胞质膜破裂，从而使核酸释放到裂解液中。均质化不充分可能会导致RNA产量和纯度下降。下面列举了几种常见的样品均质化处理办法：

A:液氮处理

切取适量组织称重，置于预冷的研钵中，迅速加入液氮，将组织研磨成粉末，然后将粉末倒入预冷的离心管中（注意：预先冷却离心管，否则样品倒入时，液氮沸腾会造成样品损失）。待液氮完全挥发后，加入适量的RNA Isolater涡旋混匀。由于液氮研磨只能起到打散样品的作用，所以最好再用注射器吹打或机械匀浆器匀浆，以降低裂解液的粘稠度。

B:机械匀浆器匀浆

机械匀浆器能高效匀浆大部分组织和细胞，并同时起到打散和匀浆的作用。把样品置于合适的1~5 ml玻璃管或离心管中，加入RNA Isolater，把转子插入RNA Isolater中，低温高速间断匀浆，每次为10~30 sec，间隔相同时间直至样品完全匀浆。使用机械匀浆器时，一般组织都可以在一分钟内达到理想的匀浆效果。大部分的机械匀浆器都带有不同大小的转子，小体积的裂解液适合使用较小的转子。

C:玻璃匀浆器

把样品和适量的裂解液转移至玻璃匀浆器中，上下推磨直至组织块被充分打散。

07-1/方案1、细胞小分子RNA的提取

该方案适合于从少于 5×10^6 个培养细胞样品中富集小分子RNA (<200 nt)。若不需要去除大分子RNA (>200 nt)，可在第5步操作后接方案4抽提总RNA(含大分子RNA和小分子RNA)。

1. 收集细胞
 - a. 悬浮培养细胞：计算细胞数量，300 g离心5 min收集细胞，小心弃除培养液，按第2步进行操作。
 - b. 贴壁细胞：贴壁细胞可在培养瓶/皿中直接裂解，也可经胰酶消化后离心收集。
 - ▲ 直接裂解：计算细胞数量，彻底弃除培养液，按第2步进行操作。
 - ▲ 胰酶消化处理：计算细胞数量，弃除培养液，加入适量PBS清洗细胞，弃除PBS，再加入含0.1~0.25%胰酶 (Trypsin)的PBS消化细胞。当细胞从壁上脱落后，加入含血清的培养液，并转移至离心管，300 g离心5 min。收集细胞，按第2步进行操作。
2. 加入1 ml RNA Isolater至细胞样品中。涡旋或吸打处理细胞沉淀团。
 - ▲ 离心收集的细胞：先弹打使细胞松散，再加入1 ml RNA Isolater，用移液枪吸打10~15次彻底打散细胞。
 - ▲ 贴壁细胞直接裂解：彻底弃除培养液后，向培养瓶或培养皿中加入1 ml RNA Isolater。用枪吹打使细胞从壁上完全脱落，收集裂解液，并转移至离心管中。
3. 室温放置2~3 min让细胞充分裂解。
 - ▲ 此时样品可在2~8℃保存一周，-20℃至-70℃保存六个月以上。
4. 加入200 μl氯仿至裂解液中。用手剧烈振荡15 sec，室温静置3 min。
 - ▲ 用涡旋取代振荡可能会带入基因组DNA污染。
5. 4℃，12,000 g离心15 min。吸取500 μl的上清液至新的1.5 ml离心管中。按第6~16步进行操作富集小分子RNA，或按方案4提取总RNA(含小分子RNA和大分子RNA)。
 - ▲ 请小心吸取上清水相，避免吸到中间层和下层有机相而影响后续提取结果。
6. 加入160 μl的无水乙醇至上清液中，涡旋混匀10 sec。

(以下离心均在室温下进行。)
7. 把RNA柱 (MiPure RNAspin Column)置入2 ml收集管(Collection Tube)。将上述混合液转移至RNA柱中。12,000 g离心30 sec。
 - ▲ 若需提取大分子RNA，保留RNA柱，按方案3提取大分子RNA(>200 nt)。
8. 加入0.9倍体积的无水乙醇至滤液中，用移液枪吸打混匀3~5次。
 - ▲ 举例：若滤液体积为640 μl，则需加入576 μl无水乙醇。
9. 把miRNA柱 (MiPure miRNA Column)置入2 ml收集管中。转移一半体积的混合液至miRNA柱中。12,000 g离心30 sec。
10. 弃滤液，把miRNA柱置回收集管中。转移剩余混合液至miRNA柱中，12,000 g离心30 sec。
11. 弃滤液，把miRNA柱置回收集管中。加入500 μl Buffer miRW1(已加乙醇!)至miRNA柱中，室温放置1 min，12,000 g离心30 sec。

12. 弃滤液，把miRNA柱置回收集管中。加入500 μ l Buffer miRW2(已加乙醇!)至miRNA柱中，室温放置1 min，12,000 g离心30 sec。
13. 弃滤液，把miRNA柱置回收集管中。加入500 μ l 80%乙醇(需用RNase-free ddH₂O新鲜配制)至miRNA柱中，室温放置1 min，12,000 g离心30 sec。
14. 弃滤液，把miRNA柱置回收集管中。12,000 g离心空柱2 min，甩干miRNA柱的基质。这一步可彻底去除miRNA柱中残留的乙醇。
15. 将miRNA柱转移至新的1.5 ml离心管。室温晾干2~5 min，加入30~50 μ l RNase-free ddH₂O至miRNA柱的膜中央。室温静置2 min。12,000 g离心1 min以收集滤液。
▲ MiPure miRNA Column 最小的洗脱体积是30 μ l，小于30 μ l会导致RNA的洗脱效率下降。
16. 丢弃miRNA柱，收集的miRNA样品于-70°C保存。

07-2/方案2、动物组织小分子RNA的提取

该方案适合于从少于100 mg动物组织中富集小分子RNA(<200 nt)。若不需要去除大分子RNA(>200 nt)，可在第6步后按方案4抽提总RNA(含大分子RNA和小分子RNA)。

1. 组织用量

组织用量是RNA产量和纯度的关键因素。试剂盒的组织用量可低至0.01 mg，但最大的组织用量取决于样品中RNA、蛋白质和杂质的含量。

▲ 动物脑组织、脂肪组织，RNA含量较低，组织最大用量可至100 mg；

▲ 动物肝脏、脾脏、肾脏、胸腺等，含有丰富的RNA，组织用量不要超过20 mg；

▲ 心脏、肌肉、皮肤含有中丰度的RNA，组织用量不要超过50 mg。

*MiPure miRNA Column 结合能力为200 μ g。过多的组织用量会造成RNA降解及大分子RNA的污染。

如果处理的组织没有相关的信息，推荐第一次起始用量为30 mg，根据获得的结果来提高或降低组织的用量。

2. 组织的裂解和匀浆：按10~100 mg的组织量，加入1 ml RNA Isolater。

▲ 选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第5页“样品的处理”。

3. 室温放置2~3 min让组织充分裂解。

4. (可选) 4°C，12,000 g离心10 min。小心吸取上清液至新的离心管中。

▲ 处理脂肪样品时，离心后溶液表面会飘浮一层油脂类，小心转移下层清液至新管。

5. 加入200 μ l氯仿至裂解液或上清液中。用手剧烈振荡15 sec，室温静置3 min。

▲ 用涡旋取代振荡可能会带入基因组DNA污染。

6. 4°C，12,000 g离心15 min。吸取500 μ l上清液至新的1.5 ml离心管中。

▲ 请小心吸取上清水相，避免吸到中间层和下层有机相而影响后续提取结果。

按方案1的第6~16步进行操作富集小分子RNA或按方案4进行操作提取总RNA(含小分子RNA)。

07-3/方案3、大分子RNA的提取

该方案适合于从各种样品中提取大分子RNA。

1. 取方案1或2中结合了大分子RNA的RNA柱(MiPure RNAspin Column)置于2 ml收集管中。

2. 加入500 μ l Buffer miRW1(已加乙醇!)至柱中，室温放置1 min，12,000 g离心30 sec。

3. 弃滤液，把RNA柱置回收集管中。加入500 μ l Buffer miRW2(已加乙醇!)至柱中，室温放置1 min；12,000 g离心30 sec。

4. 弃滤液，把RNA柱置回收集管中。加入500 μ l 80%乙醇(需用RNase-free ddH₂O新鲜配制)至柱中，室温放置1 min，12,000 g离心30 sec。

5. 弃滤液，把RNA柱置回收集管中。12,000 g离心空柱2 min，甩干RNA柱的基质。

6. 将RNA柱转移至RNase-free 1.5 ml离心管中。室温晾干2~5 min，加入30~50 μ l RNase-free ddH₂O至RNA柱的膜中央，室温静置2 min。12,000 g离心1 min。

7. (可选) 再加入30~50 μ l RNase-free ddH₂O至RNA柱的膜中央，室温静置2 min。12,000 g离心1 min。

▲ MiPure RNAspin Column 最小的洗脱体积是30 μ l，小于30 μ l会导致RNA的洗脱效率下降。若RNA产量超过30 μ g，推荐按第7步进行第二次洗脱以获得更高产量。

8. 丢弃RNA柱，离心收集得到的大分子RNA于-70°C保存。

07-4/方案4、总RNA提取 (含大分子、小分子RNA)

该方案适合于从细胞及组织样品中直接提取总RNA, 包括大分子RNA和小分子RNA。在某些qRT-PCR定量分析实验中, 该方法得到的miRNA其C_T值更加稳定。但总产率略低于单独提取小分子RNA。

- 取方案1、2的500 μl上清液(氯仿抽提后的上清液)至新的离心管中。
▲ 请小心吸取上清水相, 避免吸到中间层和下层有机相而影响后续提取结果。
- 加入750 μl无水乙醇至上清液。涡旋混匀10 sec。
- 把RNA柱(MiPure RNAspin Column) 置于2 ml收集管中。转移一半体积的混合液至柱中, 12,000 g 离心30 sec。
- 弃滤液, 把RNA柱置回收集管中。转移剩余混合液至RNA柱中, 12,000 g离心30 sec。
- 弃滤液, 把RNA柱置回收集管中。加入500 μl Buffer miRW1(已加乙醇I)至柱中, 室温放置1 min, 12,000 g离心30 sec。
- 弃滤液, 把RNA柱置回收集管中。加入500 μl Buffer miRW2(已加乙醇I)至柱中, 室温放置1 min, 12,000 g离心30 sec。
- 弃滤液, 把RNA柱置回收集管中。加入500 μl 80%乙醇(需用RNase-free ddH₂O新鲜配制)至柱中, 室温放置1 min, 12,000 g离心30 sec。
- 弃滤液, 把RNA柱置回收集管中。12,000 g离心空柱2 min, 甩干RNA柱的基质。
- 将RNA柱转移至RNase-free 1.5 ml离心管中。加入30~50 μl RNase-free ddH₂O至RNA柱的膜中央。室温静置2 min。12,000 g离心1 min。
- (可选) 再加入30~50 μl RNase-free ddH₂O至RNA柱的膜中央。室温静置2 min。12,000 g离心1 min。
▲ MiPure RNAspin Column 最小的洗脱体积是30 μl, 小于30 μl 会导致RNA的洗脱效率下降。若RNA产量超过30 μg, 推荐按第10步进行第二次洗脱以获得更高产量。
- 丢弃RNA柱, 将收集得到的总RNA(含小分子RNA)样品于-70℃保存。

08/常见问题与解决方案

现象	原因及解决方法
离心后分层现象不明显	
没有加氯仿或氯仿不纯	确保加入氯仿, 氯仿不含有异戊醇或其它添加成分;
加入氯仿后混匀效果不好	加入氯仿后, 一定要剧烈振荡混匀15 sec。颠倒或涡旋会导致分离不明显或引入DNA污染。如果离心后分离不明显, 重复振荡和静置, 然后再离心;
样品中含有机溶剂	若样品含有有机溶剂如DMSO、乙醇、强碱试剂会影响分层。
RNA产量低	
样品匀浆不充分	处理培养细胞时, 反复吹打裂解液进行裂解; 处理动物组织时, 推荐使用机械匀浆器匀浆;
样品起始用量太多	根据说明书给出的参考用量及实际情况来决定样品用量;
RNA的洗脱效率低	RNase-free ddH ₂ O没有加到膜上, 或洗脱体积不够。 可加入预热的30-50 μl RNase-free ddH ₂ O到膜上, 室温静置2 min, 然后离心洗脱RNA。
RNA降解	
组织/细胞用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件;
RNase污染	操作过程避免RNase的污染, 参考第5页“实验准备”。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入Buffer miRW2或80%乙醇后, 静置2 min后再离心;
乙醇污染	空柱离心转速高于或等于12,000 g, 离心时间为2 min;
膜材料脱落	脱落到产物中硅胶膜是不溶解的, 可通过12,000 g离心2 min, 仅分离含有小RNA的液体成分保存。