

## GenXion Universal microRNA Kit

### GenXion 通用 microRNA 快速提取试剂盒 (免氯仿)

货号：GxRNA88

- ❖ **适用范围：**适用于组织/细胞/普通植物/外泌体等提取 microRNA/包含总 RNA。
- ❖ **试剂盒组成、储存、稳定性：**

试剂盒组成	保存	50 次
裂解液 MRL	室温	25
Wash Solution 1	室温	12 ml 第一次使用前加入 28ml 无水乙醇
Wash Solution 2/3	室温	10 ml 第一次使用前加入 42ml 无水乙醇
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	10 ml
基因组 DNA 清除柱 和收集管	室温	50 套
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

- ❖ **储存事项：**
1. 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
  2. 不合适的储存于低温（4℃ 或者 -20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃-25℃）进行。
  3. Wash Solution 2/3 可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体，并不影响使用，直接不吸晶体，吸上清使用就可以。
  4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

## ❖ 产品介绍：

传统的 microRNA 提取试剂盒均是采用异硫氰酸胍/苯酚/氯仿（TRIzol 法）加高浓度乙醇硅胶膜吸附小片段 microRNA 的原理方法制成。但是该方法使用的苯酚/氯仿因其对身体的毒性致癌作用和环境保护受到越来越多的限制。同时 Trizol 法原理适用范围窄，对于某些样品，提取 microRNA 效果不佳。

而本试剂盒在公司领先 RNA/microRNA 提取技术的基础上，创新性的采用了不用苯酚，氯仿的技术路线解决该问题。独特的通用裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱，基因组 DNA 被清除而 RNA（包括 microRNA）被选择性滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列特殊漂洗液快速的漂洗—离心的步骤，将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA（包括 microRNA）从硅基质膜上洗脱。

## ❖ 产品特点：

1. 完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速简捷，比传统 microRNA 提取试剂盒大大减少了操作时间和步骤。
3. 既可以得到总 RNA（包含了 microRNA），也可以采用分提取操作步骤单独纯化富集后的 microRNA 组分和总 RNA（>200 nt）从而得到分离富集的 microRNA 和 RNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 典型的比值达 2.0~2.2，可用于 RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

## ❖ 注意事项

1. **所有的离心步骤均可在室温完成**，使用转速可以达到 12,000 rpm 的传统台式离心机。
2. 需要自备乙醇，研钵(可选)。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量 时可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
4. 裂解液 MRL 和 Wash Solution 1 中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。如不慎沾染，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**

5. 关于 DNA 的微量残留：一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留（DNase 消化也无法做到 100%无残留），该产品由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术，绝大多数 DNA 已经被清除，个别特殊情况需要清除微量基因组 DNA 残留，可使用以下几种 DNA 酶消化的方式。

- 1) 传统 DNA 酶消化提取的 RNA/microRNA，热灭活 DNA 酶后直接用于后续实验。
- 2) 传统 DNA 酶消化提取的 RNA/microRNA，然后按照 **RNAclean Plus 增强型 RNA 清洁纯化试剂盒 (含小 RNA)** 纯化回收。
- 3) 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 柱上消化处理。购买 DNA 酶柱上消化试剂盒可先索取具体操作说明书。

❖ **操作步骤：**（实验前先阅读注意事项）提示：

↪ 第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶加入指定量无水乙醇！

### （一）样品处理

#### 1. 培养细胞：

- a. **悬浮细胞**：直接离心收集细胞，12,000 rpm 离心 15 sec 使细胞沉淀下来，彻底去上清后直接加入 500  $\mu$ l ( $< 8 \times 10^6$  个细胞) 裂解液 MRL 涡旋震荡或者吹打裂解细胞。
- b. **贴壁细胞**：不需胰酶消化，彻底吸干净培养液体后直接加 500  $\mu$ l ( $< 8 \times 10^6$  个细胞) 裂解液 MRL 反复吹打裂解细胞；不方便直接裂解的培养容器，可以用细胞刮子刮下细胞，或者胰蛋白酶消化后吹打下来收集细胞到 1.5ml 离心管，离心，彻底弃上清后加 500  $\mu$ l ( $< 8 \times 10^6$  个细胞) 裂解液 MRL 涡旋震荡或者吹打裂解细胞。

#### 2. 动物组织：

- a. **匀浆处理**：取 10-25mg 新鲜组织加入 500  $\mu$ l 裂解液 MRL 后，使用玻璃匀浆器或电动匀浆器进行匀浆，至无明显组织块即可。
- b. **液氮研磨**：在液氮中研磨组织成细粉后，取适量组织细粉(10-25 mg)转入装有 500  $\mu$ l 裂解液 MRL 的 1.5ml 离心管中，涡旋震荡直至无明显粉末团即可。

### 3. 普通植物：

- a. 取 500 $\mu$ l 裂解液 MRL，转入 1.5ml 离心管中。
- b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后，取 50mg-100mg 细粉转入上述装有 MRL 的离心管，立即剧烈振荡 20 秒，充分裂解。
- c. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- d. 将裂解物 12,000 rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片。

### (二) 总 RNA (包含 microRNA) 提取

1. 将前面步骤得到的裂解匀浆液或者离心后的上清全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。立即 12,000 rpm 离心 1 分钟，收集滤液（RNA/microRNA 在滤液中）。
2. 用微量移液器较精确估计滤过液体积（480  $\mu$ l 左右，滤过时候损失体积应该减去），加入 1.25 倍体积的无水乙醇，此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。
3. 立刻将混合物(每次小于 700  $\mu$ l，多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

**确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。**

4. 加 700  $\mu$ l Wash Solution 1 (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
5. 加入 500  $\mu$ l Wash Solution 2/3 (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500  $\mu$ l Wash Solution 2/3，重复一遍。
6. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
7. 取出吸附柱 RA，放入一个 1.5ml 新离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50  $\mu$ l RNase free water，室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

**将洗脱液加回到吸附柱重复洗脱步骤一遍可以提高产量约 10-15%。**

8. 得到的 RNA/microRNA 可以立即用于下游反应或者尽快置于低温保存。

## 附录 1：microRNA 相对富集方法（microRNA/去除了 microRNA 的总 RNA 分别提取）

### 提示：

⇒ 第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶加入指定量无水乙醇！

1. 首先按照（一）**样品处理** 准备好裂解匀浆液或者离心后的上清。
2. 在裂解匀浆液或者离心后的上清加入一半体积的无水乙醇（**0.5 体积**），此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。
3. 将混合物（每次小于 720  $\mu\text{l}$ ，多可以分两次加入）加入一个基因组清除柱中，（清除柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 2 分钟，**保留滤液（microRNA 在滤液中）**。

此时，滤过液含有 microRNA，基因组 DNA 清除柱子上面是去除了 microRNA 的总 RNA（不包含 microRNA），如果需要，可以按照前面标准操作步骤 4 - 8 操作漂洗，洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。

6. 用微量移液器较精确估计滤过液体积，加入等体积无水乙醇（必须是室温的），涡旋或者吹打充分混匀，不要离心。
7. 立刻将混合物（每次小于 700  $\mu\text{l}$ ，多可以分两次加入）加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 2 分钟，弃掉废液。

确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。

8. 按照前面标准操作步骤 4-8 操作漂洗，洗脱得到富集的 microRNA。

**注意：**不同的实验可以选择不同的方法，例如 Northern Blot 或者表达芯片谱分析可以选择提取包括 microRNA 的总 RNA。相对富集方法提取的 microRNA 因为去除了较大片段的 mRNA 和 rRNA 等，可能减少某些下游试验的扩增背景，当背景较高或者非特异扩增较多时，可以尝试使用相对富集方法提取的 microRNA。总的原则是首选提取使用总 RNA（包含了 microRNA）做实验，只有确实使用总 RNA（包含 microRNA）效果不佳的时候，或者实验设计要求必须富集分离 microRNA 和 mRNA，才尝试采用富集 microRNA 的方法。

## 附录 2：DNA 酶柱上消化 ( 详细请参考 RN34 DNaseI 柱上消化试剂盒说明书)

1. 按照前面所列操作步骤操作，直到做完操作步骤 3。
2. 取 45 $\mu$ l DNase I buffer 和 5 $\mu$ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液 ( 处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液 ) 。
3. 向吸附柱 RA 中加入 350 $\mu$ l Wash Solution 1，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
4. 向吸附柱 RA 中央加入 50 $\mu$ l 的 DNaseI 工作液，室温 (20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C) 放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上向膜四周浸润充分和膜接触，不要让工作液滴在 O 型垫圈或是离心柱管壁上挂壁或者挂在垫圈上不能充分和膜接触。
5. 向吸附柱 RA 中加入 350 $\mu$ l Wash Solution 1，12,000 rpm 离心 30-60 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
5. 接操作步骤 5 完成后续步骤。

官方网址：[www.genesion.com.cn](http://www.genesion.com.cn)

公司邮箱：[GenXion@vip.qq.com](mailto:GenXion@vip.qq.com)

订货热线：4006-169-114、020-84224925

