

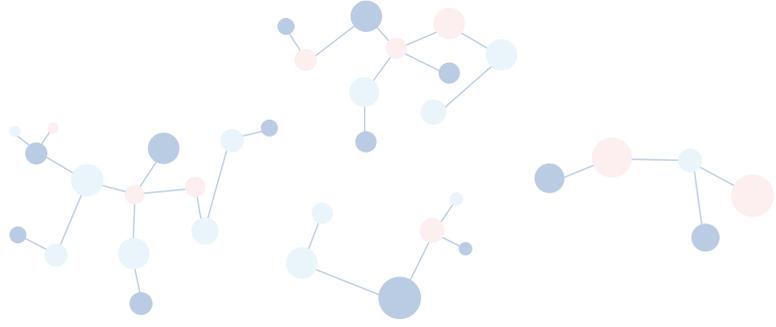
Trelief[®] Universal miRNA Extraction Kit
通用型miRNA提取试剂盒



TSR4001-50

使用说明书

1.1.1.20221114



目录

Contents

产品简介	01
产品组成	01
产品特点	01
注意事项及准备	01
操作步骤	02
方案1:多种样品小分子RNA的提取	03
方案2:大分子RNA的提取	05
方案3:总RNA (含大分子和小分子)的提取	05
方案4:血清, 血浆总RNA (包括小分子RNA) 的提取	06
常见问题及解决方案	06
保存条件	07
技术支持	07

■ 产品简介

本产品适用于从多种生物样品中提取高纯度的小分子RNA (miRNA, <200 nt), 适合的生物样品包括:1×10^7个真核培养细胞、100 mg动物组织、100 mg植物组织、5×10^7个酵母培养细胞和1×10^9个细菌细胞等。本产品结合了高效的一步法抽提试剂和硅胶柱纯化技术, 整个提取过程只需50 min, 提取得到的高纯度RNA可直接用于RT-PCR、Northern Blot、芯片分析、miRNA文库构建等。本产品使用低毒试剂替代高毒性的氯仿, 使用过程安全性更高。本产品也可用于提取大分子RNA (>200 nt) 或总RNA (含miRNA), 满足不同实验需求。

■ 产品组成

组分	TSR4001-50 (50次)	保存条件及稳定性
Buffer LS	60 mL	2~8°C避光保存18个月
Buffer miRWA	20 mL	15~25°C保存18个月
Buffer miRWB	2×20 mL	15~25°C保存18个月
Buffer BCP	6 mL	15~25°C保存18个月
RNase-Free ddH ₂ O	30 mL	15~25°C保存18个月
RNA Spin Columns T1 (吸附柱T1)	50个	15~25°C保存18个月
RNA Spin Columns T2 (吸附柱T2)	50个	15~25°C保存18个月
Collection Tubes (2 mL收集管)	100个	15~25°C保存18个月

■ 产品特点

- 适用性广: 适用于从多种生物样品中提取miRNA, 包括动物、细胞、植物、细菌等。
- 兼容性强: 除了可以提取小分子RNA, 还可以提取大分子RNA或总RNA。
- 操作简便: 50 min内即可完成所有操作。
- 纯度高: 提取的RNA无DNA和蛋白污染, 利于下游实验的分析。

■ 注意事项及准备

1. 自备材料: 无水乙醇、无RNase的1.5 mL离心管和枪头、小型台式离心机、移液枪、β-巯基乙醇 (处理酵母样品)、Lyticase (处理酵母样品)、Buffer SE (处理酵母样品, 配方见方案1中酵母样品处理第3步)、Lysozyme (处理细菌样品)、Buffer TE (处理细菌样品, 配方见方案1中细菌样品处理第3步)。
2. 第一次使用前, 按下表在Buffer miRWA和Buffer miRWB中加入指定体积的无水乙醇, 混匀后方可使用, 并做好标记。

组分	Buffer miRWA	Buffer miRWB
无水乙醇的加入量	40 mL	每瓶加入80 mL

3. Buffer LS含有苯酚等物质,操作过程中应穿戴相应防护用品,避免沾染皮肤、眼睛及衣物,防止口鼻吸入。如不慎沾染皮肤或眼睛,及时用大量清水或生理盐水冲洗,必要时寻求医生帮助。
4. 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)因RNase-Free ddH₂O中不含任何抑菌因子,室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装RNase-Free ddH₂O并保存于-20°C,以减少污染。若RNase-Free ddH₂O污染微生物,请重新配制。
 - (4)RNA实验所用试剂都应专用,避免混用后造成交叉污染。

■ 操作步骤(实验前请先阅读注意事项)

样品打散和匀浆的方法

样品的打散及匀浆是RNA提取必需的步骤。样品打散是为了让组织或细胞块快速分散、细胞壁和细胞质膜破裂,从而使核酸释放到裂解液中。匀浆是指用适当的方法打断细胞内高分子量的基因组DNA和高分子量的物质,以降低溶液的粘稠度。打散或匀浆不充分都可能会导致RNA产量和纯度下降,还可能堵塞柱子。有些处理方法兼具打散和匀浆两种功能,如机械匀浆器;而另一些方法只起到打散的作用,如处理细胞时加入裂解液用枪吸打或涡旋,这样就还需要结合其他方法来打断基因组DNA。下面列举了几种常见的样品打散和匀浆方法。

1. 液氮研磨

使用液氮时,请戴上手套并小心处理。取适量组织于预冷的研钵中,迅速加入液氮研磨成粉末,然后将粉末倒入预冷的离心管中。注意预先冷却离心管,防止样品倒入时,液氮沸腾而损失样品。当液氮完全挥发后,称重并加入适当的Buffer LS,涡旋混匀。由于液氮研磨只能起到打散样品的作用,故建议继续使用注射器或机械匀浆器匀浆,以减低裂解液的粘稠度。

2. 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,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,加入裂解液,将探头插入裂解液中,高速间断匀浆,每次为15~30 s,直至样品完全匀浆。使用机械匀浆器一般组织都可以在1 min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探头,小体积的裂解液适合使用较小的探头。

3. 玻璃珠高速震荡

使用玻璃珠高速震荡也能有效地裂解样品。细胞、小型生物如线虫、微量组织、酵母可用0.4~0.6 mm酸洗玻璃珠,细菌可用0.1~0.2 mm酸洗玻璃珠。把样品转移至离心管中,加入100~500 μL酸洗玻璃珠,再加入适量的Buffer LS,高速震荡。使用该方法,最好采用珠磨器,珠磨效果取决于样品的大小、细胞壁厚度以及珠磨器功率,详细的操作应根据仪器进行调整。常见的涡旋仪亦可使用,但效果较差。

4. 玻璃匀浆器匀浆

玻璃匀浆器使用简单、容易获得,是常用的匀浆方法之一。它能有效处理各种软组织如肝脏、脾脏、肾、脑等。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匀浆。

5. 注射器匀浆

处理培养细胞或小量动物柔软组织,如脑、胚胎等可用小型注射器(带20#针头)进行抽打。此外,小型注射器还可以同时打断基因组DNA和其它高分子物质,起到降低裂解液的粘稠度的作用。注射器匀浆是处理细胞最常用的方法。

方案1: 多种样品小分子RNA的提取

该方案适用于提取小分子RNA (<200 nt), 适用的样品有 $\leq 1 \times 10^7$ 个培养细胞、<100 mg动物组织、 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 个酵母细胞、 $< 1 \times 10^9$ 个细菌细胞和<100 mg植物组织。若不需要去除大分子RNA (>200 nt), 可按方案3: 总RNA (含大分子RNA和小分子RNA) 的提取进行操作。除步骤中特别说明外, 以下离心均在室温条件下进行。

1. 样品处理

(1) 细胞样品处理

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(血清可抑制胰酶), 并转移至离心管中, 300×g离心5 min。彻底弃除溶液, 并按第2) 步进行操作。

2) 加入1 mL Buffer LS至细胞样品中。涡旋或吸打打散细胞沉淀团。

- 离心收集的细胞: 先弹打或涡旋使细胞松散, 加入1 mL Buffer LS。用移液枪吸打10~15次打散细胞。
- 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 Buffer LS。用枪吹打使细胞从壁上脱落, 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。

注: 此时样品可在2~8°C保存1周, -20°C至-80°C保存6个月。

(2) 动物组织样品处理

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30 mg;
- 心脏、肌肉、皮肤含有中丰度的RNA, 组织用量不要超过80 mg。

注: 吸附柱T1结合能力为200 µg。过多的组织用量会造成大分子RNA的污染。如果处理的组织没有相关的信息, 我们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。(对多数组织, 3 mm立方块的重量约为25~40 mg。)

2) 组织的裂解和匀浆: 按10~100 mg的组织量, 加入1 mL Buffer LS。选择合适的匀浆工具进行匀浆, 详细参照“样品打散和匀浆的方法”部分。

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。小心转移上清液至新的离心管中。

注: 处理脂肪样品时, 离心后溶液表面会飘浮一层油脂类, 小心吸弃油脂层。

(3) 酵母样品处理

1) 酵母细胞的用量

酵母生长情况可以通过分光光度计进行测量。由于不同仪器的差别和各种生长条件的影响, 很难给出OD值与酵母细胞数量之间的精确可靠的关系。例如: 每毫升含 2×10^7 个酵母细胞的培养液, 稀释4倍后, 在Beckman DU-40测量时, OD₆₀₀为0.125; 在DU-7400测量时, OD₆₀₀为0.25。因此我们建议使用平板计数法来校准仪器测量的OD值。测量OD值时, 需对样品进行稀释或浓缩, 以确保读数在0.05~0.3的可信区间内。由于不同酵母中RNA含量不一致, 我们推荐先用 2×10^7 个酵母作为起始用量, 根据获得的产量和纯度, 再调整酵母的

用量。

2) 4°C, 1000×g离心5 min收集酵母细胞, 彻底吸弃培养液。

3) 加入2 mL新配制的Buffer SE (自备, 包含β-巯基乙醇和Lyticase, 配方见下方备注), 重悬细胞, 于30°C轻轻振荡水浴10~30 min。

注: Buffer SE: 1 M Sorbitol, 0.1 M EDTA, pH7.4。使用前, 加入β-巯基乙醇至终浓度为0.1%和Lyticase至终浓度为50 U/10⁷个酵母细胞。

4) 4°C, 1000×g离心5 min收集酵母原生质体。彻底吸弃消化液。

5) 加入1 mL Buffer LS至酵母原生质体中。剧烈涡旋1 min, 室温静置5~10 min。

(4) 细菌样品处理

1) 细菌的用量

细菌生长情况可以通过分光光度计进行测量。由于不同仪器之间的差别和各种生长条件的影响, 我们很难给出OD值与细菌数量之间的精确可靠的关系。例如, 每毫升含1×10⁹个细菌的培养液, 稀释4倍后, 在Beckman DU-40测量时, OD₆₀₀为0.125; 在DU-7400测量时, OD₆₀₀为0.25。因此我们建议使用平板计数法来校准仪器测量的OD值。测量OD值时, 需对样品进行稀释或浓缩, 以确保读数在0.05~0.3的可信区间内。不同的培养条件以及不同细菌的RNA含量差别很大, 建议初次提取时, 细菌的用量为2×10⁸, 然后再根据结果进行调整。

2) 4°C, 5,000 ×g离心5 min收集细菌。倒弃培养液并彻底吸弃残液。

3) 加入100 μL含Lysozyme的Buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8.0, 1 mg/mL Lysozyme (自备)), 涡旋重悬细菌。处理葡萄球菌时, 还需要加入1 μL Lysostaphin (20 mg/mL) (自备)。

4) 37°C振荡水浴30 min。

5) 加入1 mL Buffer LS至样品中。剧烈涡旋1 min, 静置5~10 min。

(5) 植物样品处理

1) 组织用量

· 组织用量合理可以保障RNA的产量和纯度。该试剂盒的组织用量可低至0.01 mg, 但最大的组织用量却取决于样品中RNA的含量, 蛋白质和杂质的含量。

· 植物样品含有丰富的代谢物质, 推荐第一次起始用量为50 mg, 根据获得的结果调整组织的用量。不管何种情况, 组织用量都不能超过100 mg。

2) 用液氮将植物或真菌样品研磨成细小的粉末。转移50~100 mg样品至1.5 mL离心管中。立即加入1 mL Buffer LS至样品中, 涡旋混匀30~60 s打散样品。

3) 室温放置2~3 min让组织充分裂解。

4) 4°C, 12,000×g离心5 min, 小心转移上清液至新的离心管中。

2. 加入100 μL Buffer BCP至裂解液中。用手剧烈振荡15 s, 室温静置3 min。

3. 4°C, 12,000×g离心15 min。转移500 μL的上清液至新的1.5 mL离心管中。按第4~13步进行操作富集小分子RNA, 或按方案3提取总RNA (含小分子RNA和大分子RNA)。

注: 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。

若不需要去除大分子RNA, 按方案3: 总RNA (含大分子和小分子) 的提取进行操作。某些实验表明, 方案3有利于提高小分子RNA产量的稳定性。初步使用该产品时, 建议对两个方案进行比较, 根据实验结果进行选择。

(以下离心均在室温下进行。)

4. 加入160 μL无水乙醇至上清液中, 涡旋混匀10 s。

5. 将吸附柱T1装在2 mL收集管中。转移混合液至吸附柱T1中。8,000×g离心30~60 s。

注: 若需提取大分子RNA, 保留吸附柱T1, 按方案2提取大分子RNA (>200 nt)。

6. 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560 μL , 则需加入504 μL 无水乙醇。

- 7.将吸附柱T2装在2 mL收集管中。转移一半体积混合液至吸附柱T2中。8,000 \times g离心30~60 s。
- 8.弃滤液, 将吸附柱T2装回收集管。转移剩余混合液至吸附柱T2中。8,000 \times g离心30~60 s。
- 9.弃滤液, 将吸附柱T2装回收集管。加入500 μL Buffer miRWA (请先检查是否加入乙醇) 至吸附柱T2中, 8,000 \times g离心30~60 s。
- 10.弃滤液, 将吸附柱T2装回收集管中。加入500 μL Buffer miRWB (请先检查是否加入乙醇) 至吸附柱T2中, 8,000 \times g离心30~60 s。
- 11.重复步骤10一次。
- 12.弃滤液, 将吸附柱T2装回收集管中。13,000 \times g空柱离心2 min, 倒掉废液, 将吸附柱T2开盖置于室温数分钟, 以充分晾干硅胶膜上残留的乙醇。
- 13.将吸附柱T2转移至新的1.5 mL离心管。加入15~30 μL RNase-Free ddH₂O至柱子的膜中央, 室温静置2 min。13,000 \times g离心1 min。丢弃柱子, 将洗脱得到的RNA保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 。

方案2: 大分子RNA的提取

该方案适用于从多种样品(方案1中包含的样品)中提取大分子RNA, 不包含小分子RNA。

- 1.取方案1步骤5中结合了大分子RNA的吸附柱T1装在2 mL收集管中。
- 2.加入500 μL Buffer miRWA (请先检查是否加入乙醇) 至吸附柱T1中, 8,000 \times g离心30~60 s。
- 3.弃滤液, 将吸附柱T1装回收集管中。加入500 μL Buffer miRWB (请先检查是否加入乙醇) 至吸附柱T1中, 8,000 \times g离心30~60 s。
- 4.重复步骤3一次。
- 5.弃滤液, 将吸附柱T1装回收集管中。13,000 \times g空柱离心2 min, 倒掉废液, 将吸附柱开盖置于室温数分钟, 以充分晾干硅胶膜上残留的乙醇。
- 6.将吸附柱T1转移至1.5 mL离心管中。加入30~100 μL RNase-Free ddH₂O至柱子的膜中央。室温静置2 min。13,000 \times g离心1 min。
- 7.(可选)再加入30~100 μL RNase-Free ddH₂O至柱子的膜中央。室温静置2 min, 13,000 \times g离心1 min。
注:吸附柱T1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7步进行第二次洗脱以获得更高产量。
- 8.丢弃柱子, 将洗脱得到的大分子RNA保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 。

方案3: 总RNA (含大分子和小分子)的提取

该方案适合于从多种样品(方案1中包含的样品)中直接提取总RNA, 包括大分子RNA和小分子RNA。研究表明, 在某些RT-PCR定量分析实验中, 该方法得到的RNA其CT值更加稳定。

- 1.取方案1步骤3的上清液(Buffer BCP抽提后的上清液)至新的离心管中。
- 2.加入1.5倍体积无水乙醇至上清液, 涡旋混匀20 s。
举例:如上清液的体积为500 μL , 则需加入750 μL 无水乙醇。
- 3.将吸附柱T1装在2 mL收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。8,000 \times g离心30 s。
- 4.弃滤液, 将吸附柱T1装回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。8,000 \times g离心30 s。
- 5.弃滤液, 将吸附柱T1装回收集管中。加入500 μL Buffer miRWA (请先检查是否加入乙醇) 至吸附柱T1上。8,000 \times g离心60 s。
- 6.弃滤液, 将吸附柱T1装回收集管中。加入500 μL Buffer miRWB (请先检查是否加入乙醇) 至吸附柱T1中。8,000 \times g离心30 s。

- 7.重复步骤6一次。
- 8.弃滤液,将吸附柱T1装回收集管中。10,000×g空柱离心2 min,倒掉废液,将吸附柱开盖置于室温数分钟,以充分晾干硅胶膜上残留的乙醇。
- 9.将吸附柱T1转移至1.5 mL离心管中。加入30~100 μL RNase-Free ddH₂O至柱子的膜中央。室温静置2 min。10,000×g离心1 min。
- 10.(可选)再加入30~100 μL RNase-Free ddH₂O至柱子的膜中央。室温静置2 min。10,000×g离心1 min。
注:吸附柱T1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。
- 11.丢弃柱子,将洗脱得到的总RNA(含小分子RNA)保存于-80°C。

方案4: 血清, 血浆总RNA(包括小分子RNA)的提取

该方案适用于从100 μL血清、血浆、无细胞培养液中提取总RNA,包括小分子RNA。处理更大体积(100~250 μL)的血清/血浆等样本时,推荐使用血液总RNA(miRNA)提取试剂盒(目录号:TSR4201-50)。

- 1.转移100 μL血浆、血清或其它无细胞液体样品至1.5 mL离心管中。
- 2.加入1 mL Buffer LS至样品中,涡旋混匀。室温放置10 min。
- 3.加入100 μL Buffer BCP至裂解液中。用手剧烈振荡15 s,室温放置3 min。
- 4.4°C, 12,000×g离心15 min,转移上清液至新的1.5 mL离心管中。
- 5.加入等体积异丙醇,涡旋混匀。室温静置10 min。
- 6.将吸附柱T2装在2 mL收集管中。转移一半体积混合液至吸附柱T2中。8,000×g离心30~60 s。
- 7.弃滤液,将吸附柱T2装回收集管。转移剩余混合液至吸附柱T2。8,000×g离心30~60 s。
- 8.弃滤液,将吸附柱T2装回收集管。加入500 μL Buffer miRWA(请先检查是否加入乙醇)至吸附柱T2中,8,000×g离心30~60 s。
- 9.弃滤液,将吸附柱T2装回收集管。加入500 μL Buffer miRWB(请先检查是否加入乙醇)至吸附柱T2中,8,000×g离心30~60 s。
- 10.重复步骤9一次。
- 11.弃滤液,将吸附柱T2装回收集管中。12,000×g空柱离心3 min,倒掉废液,将吸附柱开盖置于室温数分钟,以充分晾干硅胶膜上残留的乙醇。
- 12.将吸附柱T2转移至新的1.5 mL离心管。加入15~50 μL RNase-Free ddH₂O至柱子的膜中央。室温静置2 min。12000×g离心1 min。丢弃柱子,将洗脱得到的RNA保存于-80°C。

■ 常见问题及解决方案

常见问题	可能原因	解决方法
离心后分层现象不明显	没有加入Buffer BCP或加入量不足	确保按照说明书步骤中指定体积加入Buffer BCP。
	加入Buffer BCP后混匀效果不好	加入Buffer BCP后,一定要剧烈振荡混匀15 s。颠倒或涡旋会导致分离不明显或大量的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,用注射器抽打裂解液3~5次进行匀浆; 处理动物组织时,推荐使用机器匀浆器匀浆。
	样品起始用量太多	减少样品用量,超量的样品有时会引起产量下降。
	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。再加入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。
下游实验结果不理想	RNA酶污染	操作过程引入RNase的污染,需避免引入RNase。
	盐分污染	加入Buffer miRWB后,静置5 min后,再离心。
	乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于12,000×g,离心时间为2 min。
	膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到溶液中的硅胶膜是不溶解的,可通过12,000×g离心2 min去除。

■ 保存条件

保质期18个月,试剂盒各组分保存条件见产品组成。

■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议,欢迎随时与我们联系:product@tsingke.com.cn。

