

版本号: DP230630

# miRcute Plant miRNA Isolation Kit

## miRcute多糖多酚植物miRNA提取分离试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP504

### 产品内容

产品组成	DP504 (50 preps)
裂解液SLM (Buffer SLM)	30 ml
助沉剂PLA (Buffer PLA)	3 ml
漂洗液RWA (Buffer RWA)	12 ml
去蛋白液MRD (Buffer MRD)	24 ml
无RNA酶双蒸水 (RNase-Free ddH <sub>2</sub> O)	15 ml
RNase-Free过滤柱CS (含2 ml收集管) (RNase-Free Columns CS set)	50 套
RNase-Free吸附柱miRspin (含2 ml收集管) (RNase-Free Columns miRspin set)	50 套
RNase-Free吸附柱CR4 (含2 ml收集管) (RNase-Free Columns CR4 set)	50 套
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml))	50 个

### 储存条件

试剂盒在室温 (15-30℃) 可保存15个月。加入 β-巯基乙醇的裂解液SLM 2-8℃可放置一个月。

---

## 产品简介

本试剂盒可从植物组织，特别是富含多糖多酚或淀粉的植物组织（如棉花叶片，马铃薯块茎，苹果，桃树叶片等）中快速提取包含miRNA的总RNA，可同时处理大量不同样品。提取的总RNA纯度高，没有蛋白和其它杂质的污染，可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

## 预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套。因为皮肤带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在裂解液SLM中时不会被RNase降解。但是在后续继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。
4. 配制溶液应使用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(v/v)，混匀后放置过夜，高压灭菌）。

## 使用前注意事项

1. 操作前在裂解液SLM中加入β-巯基乙醇至终浓度5%，如475 μl裂解液SLM中加入25 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的试剂 2-8℃可放置一个月。
2. 第一次使用前应在去蛋白液MRD和漂洗液RWA中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
3. 提取操作均在室温进行。

---

## 操作步骤

第一次使用前在漂洗液RWA和去蛋白液MRD中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。

### 一、miRNA富集部分的提取

对miRNA的纯度要求较高时，比如miRNA芯片研究、miRNA克隆建议采用此方法。

#### 1. 匀浆处理

50 mg植物叶片或果实果肉在液氮中迅速研磨成粉末，转入到1.5 ml离心管中，加入500  $\mu$ l裂解液SLM (使用前请先检查是否已加入 $\beta$ -巯基乙醇)，颠倒混匀以保证裂解液浸没所有样本，再加入1/10裂解液体积的助沉剂PLA，立即涡旋震荡混匀。

**注意1:** 对于预期RNA得率小于10  $\mu$ g的植物样本，请使用100 mg的起始样本量；对于富含淀粉的样本或成熟叶片，请将裂解液SLM用量增加至700  $\mu$ l。

**注意2:** 由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织RNA含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的样本量。

2. 室温，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心5 min。

3. 将上清液转移至过滤柱CS上(过滤柱CS放在收集管中)，室温12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心2 min，小心吸取收集管中的上清至新的RNase-Free的离心管中，吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。

4. 量取转移液的体积，缓慢加入转移液体积0.43倍的无水乙醇(如：500  $\mu$ l的转移液加215  $\mu$ l无水乙醇)，混匀(此时可能会出现沉淀)。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱miRspin中，室温 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心30 sec。若一次不能全部加入到吸附柱miRspin中，请分两次转入，离心后弃掉吸附柱miRspin，保留流出液。

5. 量取流出液的体积，缓慢加入流出液体积0.75倍的无水乙醇(如：700  $\mu$ l的流出液加525  $\mu$ l无水乙醇)，混匀(此时可能会出现沉淀)。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR4中，室温 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心30 sec，若一次不能全部加入到吸附柱CR4中，请分两次转入，离心后弃掉流出液，保留吸附柱CR4。

- 
6. 向吸附柱CR4中加入700  $\mu\text{l}$ 去蛋白液MRD (请先检查是否已加入乙醇)，室温静置2 min，室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心30 sec，弃废液。
  7. 向吸附柱CR4中加入500  $\mu\text{l}$ 漂洗液RWA (请先检查是否已加入乙醇)，室温静置2 min，室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心30 sec，弃废液。
  8. 重复操作步骤7。
  9. 将吸附柱CR4放入2 ml收集管中，室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min，去除残余液体。

**注意：**此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CR4在室温放置2 min，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验操作。

10. 将吸附柱CR4转入一个新的RNase-Free 1.5 ml离心管中，加50  $\mu\text{l}$  RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，室温放置2 min，室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min。

**注意：**洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu\text{l}$ ，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70 $^{\circ}\text{C}$ ，以防降解。**注意：**如果想提高RNA得率，可重复上步操作一次。

---

## 二、Total RNA的提取

提取的total RNA中含有miRNA等small RNA。对miRNA的纯度要求不高时，比如在研究miRNA RT-PCR、miRNA Northern blot时也可以采用此方法。

### 1. 匀浆处理

50 mg植物叶片或果实果肉在液氮中迅速研磨成粉末，转入到1.5 ml离心管中，加入500  $\mu$ l裂解液SLM (使用前请先检查是否已加入 $\beta$ -巯基乙醇)，颠倒混匀以保证裂解液浸没所有样本，再加入1/10裂解液体积的助沉剂PLA，立即涡旋震荡混匀。

**注意1：**对于预期RNA得率小于10  $\mu$ g的植物样本，请使用100 mg的起始样本量；对于富含淀粉的样本或成熟叶片，请将裂解液SLM用量增加至700  $\mu$ l。

**注意2：**由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的RNA含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的样本量。

2. 室温，12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心5 min。

3. 将上清液转移至过滤柱CS上(过滤柱CS放在收集管中)，12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心2 min，小心吸取收集管中的上清至新的RNase-Free的离心管中，吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。

4. 缓慢加入1.5倍上清体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR4中，12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR4放回收集管中。若一次不能全部转入吸附柱CR4，请分两步进行。

**注意：**如果上清液体积有损失，请相应调整无水乙醇的加量。

5. 向吸附柱CR4中加入700  $\mu$ l去蛋白液MRD (使用前请检查是否已加入乙醇)，12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR4放回收集管中。

---

6. 向吸附柱CR4中加入500  $\mu$ l漂洗液RWA (使用前请先检查是否已加入乙醇), 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR4放回收集管中。

7. 重复步骤6。

8. 将吸附柱CR4放入2 ml收集管中, 室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心2 min, 去除残余液体。

**注意:** 此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 离心后将吸附柱CR4在室温放置2 min, 或置于超净工作台上通风片刻, 以充分晾干。如果有漂洗液残留, 可能会影响后续的RT等实验操作。

9. 将吸附柱CR4转入一个新的RNase-Free 1.5 ml离心管中, 加50  $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 室温放置2 min, 室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心2 min。

**注意:** 洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70 $^{\circ}$ C, 以防降解。注意: 如果想提高RNA得率, 可重复上步操作一次。

---

## RNA纯度及浓度检测

**完整性：** RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件：胶浓度1.2%；0.5×TBE电泳缓冲液；150 V，15 min) 检测完整性。由于细胞中70-80%的RNA为rRNA，电泳后UV下应能看到非常明显的rRNA条带。rRNA大小分别约为5 kb和2 kb，分别相当于28S和18S rRNA；植物叶片中由于含有大量的叶绿体RNA，可见4条或更多 rRNA。植物RNA样品中最大rRNA亮度应为次大rRNA亮度的1.5-2.0倍，否则表示RNA样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

**纯度：**  $OD_{260}/OD_{280}$  比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA， $OD_{260}/OD_{280}$  读数在1.8-2.1之间，比值为2.0是高质量RNA的标志。 $OD_{260}/OD_{280}$  读数受测定所用溶液的pH值影响。同一个RNA样品，假定在10 mM Tris，pH7.5溶液中测出的 $OD_{260}/OD_{280}$  读数1.8-2.1之间，在水溶液中所测读数则可能在1.5-1.9之间，但这并不表示RNA不纯。

**浓度：** 取一定量的RNA提取物，用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O稀释*n*倍，用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O将分光光度计调零，取稀释液进行 $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$ 测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (OD_{260}) \times (\text{稀释倍数 } n) \times 40$$



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

# 浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品