

# FastPure miRNA Purification Kit Handbook

## FastPure miRNA 提取试剂盒说明书

### 产品组成

FastPure miRNA Purification Mini Kit		
产品编号	EK-1316-50T	EK-1316-100T
纯化次数	50 次	100 次
RNAex ZOL	50mL	100mL
Solution CH	10mL	20mL
Buffer RWT	15mL	30mL
Buffer RPE	12mL	24mL
RNase-Free Water	10mL	20mL
RNase-Free 吸附柱	50	100
2 mL 收集管	50	100
使用手册	1	1

### 产品介绍

本试剂盒采用高效的 RNAex ZOL 裂解技术结合硅胶膜吸附工艺，可从动物组织、细胞及细菌等样本中快速提取高质量的微小 RNA (miRNA)。该系统通过相分离技术去除大部分基因组 DNA 和蛋白质，随后通过高浓度乙醇调节，使 miRNA 选择性结合于吸附柱上。纯化后的 miRNA 可直接用于 Northern Blot、Real-Time PCR 及测序等实验。

### 存储条件

室温干燥保存可至少稳定 12 个月。

### 需要额外准备的材料

- 无水乙醇 (96%-100%)
- 无 RNase 酶的 1.5mL 离心管
- 无 RNase 酶的吸头
- 干净的手套
- 高速离心机
- 物理研磨设备

### 开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- Buffer RWT 作为浓缩液提供可能会形成沉淀，如果有沉淀出现请 37°C 加热溶解后室温使用。在第一次使用前加入 2 倍体积的乙醇 (96-100%) 以获得工作溶液。
- Buffer RPE 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 4 倍体积的乙醇 (96-100%) 以获得工作溶液。
- RNase-Free 水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，使用时尽量注意，推荐开瓶后分装保存以减少污染风险保证实验稳定性。
- RNA 在 RNAex ZOL 中短时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的无酶离心管或玻璃器皿。

**操作步骤:**

1. 请根据样品种类进行以下步骤 (1a 为动物细胞, 1b 为动物组织)

**1a. 收集动物细胞:** 悬浮细胞可直接 300×g 离心 5min 并仔细吸除上清留沉淀待使用; 单层贴壁细胞可通过直接裂解法 (吸尽培养基留下贴壁细胞, 进行步骤 2 裂解) 或胰酶处理法 (吸尽培养基留下贴壁细胞, 用 PBS 清洗细胞, 吸除 PBS 后使用含 0.10%-0.25%胰酶的 PBS 使细胞脱落, 加入含有血清的培养基使胰酶失活后转入 1.5mL 无酶离心管中 300×g 离心 5min, 吸除上清留沉淀待使用)

注意: 收集细胞数量不要超过  $1 \times 10^7$ , 收集细胞时一定要将细胞培养基去除干净, 否则会导致步骤 2 时细胞裂解不完全, 影响 RNA 与吸附柱的结合, 导致 RNA 的产量降低。

**1b. 动物组织匀浆裂解处理:** 将 10mg-30mg 动物组织转移入 1.5mL 无酶离心管中并加入 700μL RNAEx ZOL (动物组织量不要超过 30mg), 使用研磨杵或电动研磨机将动物组织彻底研磨匀浆。直接进行步骤 3。

匀浆时间根据样本裂解难易程度决定, 亦可匀浆后静置 3-5min 延长裂解时间 (期间颠倒吹匀 2-3 次)。

2. 样品裂解: 对于 1a 中使用直接裂解法的细胞应在培养皿或培养瓶中直接加入 700μL RNAEx ZOL 破碎细胞, 涡旋或吹匀混合。将裂解液移入无酶 1.5mL 离心管中。涡旋或移液器混合并确保没有细胞团块可见。

细胞沉淀不完全松吹匀可能会导致裂解效率低下和 miRNA 产量降低。一般  $\leq 3 \times 10^6$  个细胞若细胞量较大, 可涡旋后静置 3-5min 延长裂解时间 (期间颠倒吹匀 2-3 次)。若不能及时提取, 裂解后溶液可至于 -80°C 储存 3-6 个月。

3. 将含裂解物离心管置于室温静置 5min.

该步骤促进核蛋白复合物的解离。

4. 向含裂解物离心管中加入 140μL Solution CH, 用力摇动或涡旋 15s。

彻底混合对于随后的相分离很重要。

5. 将离心管置于室温静置 2-3min.

6. 在 4°C 下以 12,000×g 离心 15min。

离心后, 样品分为 3 相: 上层含有 miRNA 的无色水相; 白色的相间和较低的红色有机相。上层水相的体积应约为 350μL。

7. 将上层水相转移到新的无酶 1.5mL 离心管中, 加入约 1.5 倍体积 (通常为 525μL) 无水乙醇, 移液器吹打彻底混匀。不要离心, 立即进行下一步骤。

加入乙醇后可能会形成沉淀, 为正常现象, 不会影响提取过程和结果。

8. 将上一步骤混匀后的溶液约 700μL 转移入 RNA 吸附柱中并套上 2mL 收集管,  $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$  室温下离心 30s, 弃废液。

吸附柱最大上柱量为 700μL, 若溶液过多可分多次上柱。后续操作若无特殊说明吸附柱均置于 2mL 收集管中。

9. 向吸附柱中加入 700μL Buffer RWT (使用前请确认 Buffer RWT 是否按要求加入 2 倍体积无水乙醇),  $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$  室温下离心 30s, 弃废液。

10. 向吸附柱中加入 500μL Buffer RPE (使用前请确认 Buffer RPE 是否按要求加入 4 倍体积无水乙醇),  $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$  离心 30s, 弃废液。

11. 重复步骤 10 一次。

12. 倒弃滤液, 将吸附柱放入收集管中, 以最大转速 (~13,400×g) 离心 3min 干燥柱膜。

13. 将吸附柱套入新的无酶 1.5mL 离心管中, 并置于无酶的环境中开盖静置 5-10min 至乙醇晾干。

若吸附柱中残留乙醇将会对纯化后的 RNA 的下游实验造成影响。

14. 向吸附柱膜正中央加入 50-100μL RNase-Free Water, 盖上盖子室温静置 3-5 min。后置于离心机中  $\geq 12,000 \times g (\geq 13,000 \text{ rpm})$  离心 3min 得到 miRNA 溶液。

RNA 洗脱体积不应少于 30μL, 否则影响洗脱效率。洗脱后的 RNA 溶液应置于 -80°C 储存。