

## AxyPrep miRNA小量制备试剂盒

本试剂盒用于从各种动物组织、植物组织和细胞中提取 miRNA。提取的 miRNA 分子完整、纯度高，适用于 Northern Blot、Real-Time PCR、miRNA 微列阵芯片、原位杂交、RNase 保护测定等各种分子生物学实验。

### 一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat. No.	AP-MN-MIRNA-4	AP-MN-MIRNA-50	AP-MN-MIRNA-250
制备次数	4 preps	50 preps	250 preps
Spin/vac mini column	4	50	250
2 ml 离心管	4	50	250
1.5 ml 离心管	4	50	250
Buffer R- I	3 ml	25 ml	125 ml
Buffer R- II	1 ml	10 ml	50 ml
Buffer TE (nuclease-free)	1 ml	6 ml	30 ml
说明书	1	1	1

Spin/vac mini column: 小量制备管。室温密闭贮存。

Buffer R- I: 细胞裂解液。室温密闭贮存。

Buffer R- II: 中和液。室温密闭贮存。

Buffer TE (nuclease-free) : 洗脱液。10 mM Tris-Cl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5。  
室温密闭贮存。

### 二、注意事项

Buffer R- I 含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

### 三、实验准备

1. 所有试剂用DEPC处理过的溶剂配制。请选用RNase-free枪头和离心管，以避免提取过程中RNA被RNase降解。
2. 70%乙醇，-20℃预冷。

### 四、操作步骤

不同的样品提取miRNA的操作中略有区别，具体步骤分述如下：

### 【从动物组织中提取miRNA】

1. 取20-40 mg组织，转移至预冷的研钵中，加液氮研磨成粉末。

\*请按下面说明使用组织的量：

RNA 丰富的组织 (如肝脏)	不超过 30 mg
RNA 含量低的组织 (如肌肉)	不超过 100 mg
当使用的组织量小于 20 mg 时	R- I , R- II 和异丙醇的使用量都减半
当使用的组织量大于 40 mg 时	R- I , R- II 和异丙醇的使用量按比例增加

2. 加入400  $\mu$ l Buffer R- I，用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次，转入1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中。
3. 加入150  $\mu$ l Buffer R- II，漩涡振荡15-30 s，12,000 $\times$ g离心5 min。  
\* 建议在4 $^{\circ}$ C下离心。
4. 取上清至1.5 ml离心管中，加入180  $\mu$ l无水乙醇，混和均匀。
5. 将制备管置于2 ml离心管（试剂盒内提供）中，转移步骤4中的混合液到制备管中，12,000 $\times$ g离心1 min。  
\* 建议在4 $^{\circ}$ C下离心。  
\* miRNA在滤液中，注意保存滤液。
6. 弃制备管，在滤液中加入500  $\mu$ l异丙醇，混和均匀。
7. 12,000 $\times$ g离心10 min,弃上清。
8. 加入700  $\mu$ l 70%乙醇（-20 $^{\circ}$ C预冷），12,000 $\times$ g离心5min.
9. 弃上清,室温干燥5-10 min。
- 10.离心管中加入70  $\mu$ l Buffer TE（nuclease-free）或RNase-free水洗脱miRNA。

### 【从植物组织中提取miRNA】

1. 取30-150 mg组织，转移至预冷的研钵中，加液氮研磨成粉末。

\* 请按下面说明使用组织的量：

植物叶子	通常用量 10-80 mg
植物纤维组织	通常用量 100-150 mg
当植物叶组织量小于 30 mg 时	R- I , R- II 和异丙醇的使用量都减半
当植物叶组织量大于 80 mg 时	R- I , R- II 和异丙醇的使用量按比例增加
当植物纤维组织量大于 150 mg 时	R- I , R- II 和异丙醇的使用量按比例增加

2. 加入400  $\mu$ l Buffer R- I，用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次，转入1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中。

3. 加入150  $\mu$ l Buffer R-II, 漩涡振荡15-30 s, 12,000 $\times$ g离心5 min。  
\* 建议在4 $^{\circ}$ C下离心。
4. 取上清至1.5 ml离心管中, 加入180  $\mu$ l无水乙醇, 混和均匀。
5. 将制备管置于2 ml离心管(试剂盒内提供)中, 转移步骤4中的混合液到制备管中, 12,000 $\times$ g离心1 min。  
\* 建议在4 $^{\circ}$ C下离心。  
\* miRNA在滤液中, 注意保存滤液。
6. 弃制备管, 在滤液中加入500  $\mu$ l异丙醇, 混和均匀。
7. 12,000 $\times$ g离心10 min, 弃上清。
8. 加入700  $\mu$ l 70%乙醇(-20 $^{\circ}$ C预冷), 12,000 $\times$ g离心5min。
9. 弃上清, 室温干燥5-10 min。
10. 离心管中加入70  $\mu$ l Buffer TE (nuclease-free) 或RNase-free水洗脱MiRNA。

### 【从细胞中提取miRNA】

步骤1-3根据细胞培养的方式不同可以选择a或b两种实验方法

**a. 悬浮培养的动物细胞或从培养皿、培养瓶中获得的细胞悬浮液或新鲜分离的动物组织单细胞悬浮液:**

- 1a. 收集 $2 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ 的细胞, 2,000 $\times$ g离心5 min, 弃上清。
- 2a. 加入400  $\mu$ l Buffer R-I, 用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次, 转入1.5 ml离心管(试剂盒内提供)中。
- 3a. 加入150  $\mu$ l Buffer R-II, 漩涡振荡15-30 s, 12,000 $\times$ g离心5 min。  
\* 建议在4 $^{\circ}$ C下离心。

**b. 96-孔, 24-孔, 12-孔, 或6-孔培养板上贴壁培养的细胞:**

- 1b. 从96-孔, 24-孔, 12-孔或6-孔培养板里收集细胞, 尽量弃去培养基, 每孔加入400  $\mu$ l Buffer R-I, 用移液枪上下吹打8-10次。
- 2b. 转移上述细胞悬浮液到1.5 ml离心管(试剂盒内提供)中, 用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次。
- 3b. 加入150  $\mu$ l Buffer R-II, 漩涡振荡15-30 s, 12,000 $\times$ g离心5 min。  
\* 建议在4 $^{\circ}$ C下离心。
4. 取上清至1.5 ml离心管中, 加入180  $\mu$ l无水乙醇, 混和均匀。
5. 将制备管置于2 ml离心管(试剂盒内提供)中, 转移步骤4中的混合液到制备管中, 12,000 $\times$ g离心1 min。  
\* 建议在4 $^{\circ}$ C下离心。  
\* miRNA在滤液中, 注意保存滤液。
6. 弃制备管, 在滤液中加入500  $\mu$ l异丙醇, 混和均匀。

7.  $12,000\times g$ 离心10 min,弃上清。
8. 加入700  $\mu\text{l}$  70%乙醇（-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷）， $12,000\times g$ 离心5min.
9. 弃上清,室温干燥5-10 min。
10. 离心管中加入70  $\mu\text{l}$  Buffer TE（nuclease-free）或RNase-free水洗脱miRNA。

## 五、流程图

