

SteadyPure组织细胞Small RNA提取试剂盒

SteadyPure Tissue and Cell Small RNA Extraction Kit

Code No. AG21027

包装量: 50 rxns
保存温度: Package 2-1 4°C
 Package 2-2 室温 (15 ~ 30°C)

产品概述

本产品可从小于 50 mg 动物组织 (肝脏、心脏、皮肤、脂肪、尾等)、小于 100 mg 植物组织或小于 1.0E + 07 个培养细胞等生物样品中提取 Small RNA (包括 miRNA、siRNA、tsRNA 和 piRNA 等), 也可用于 Total RNA (包含 Small RNA) 提取。本试剂盒采用改良的裂解液和特殊的硅基质膜, 具有更强的裂解能力和对 Small RNA (< 200 nt) 的吸附能力。纯化获得的 RNA 收率高, 纯度好, 可以直接用于 Northern 杂交、体外翻译、RT-qPCR、文库构建等各种分子生物学实验。

安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂, 实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套, 然后再进行实验操作。

【注意: 使用后溶液需要收集在废液桶中专门处理。】

如果缓冲液 Buffer RLS for small RNA 或 Buffer RWA for small RNA 不小心溅出, 请立刻擦拭并用大量清水冲洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

产品组成

Buffer RLS for small RNA ^{*1}	50 ml
Buffer RWA for small RNA ^{*2}	14 ml
Buffer RWB ^{*2}	21 ml
RNase Free Water ^{*3}	10 ml
Small RNA Mini Columns	50 sets X 2
Collection tubes	50 pcs
RNase Free Tubes ^{*4}	50 pcs

*1: 组分中 Buffer RLS for small RNA 包装于 Package 2-1 中, 需放置于 4°C 保存; 其余组分均包装于 Package 2-2 中, 室温 (15 ~ 30°C) 保存。

*2: Buffer RWA for small RNA 在首次使用前, 请添加 21 ml 的无水乙醇 (Buffer RWA for small RNA 与无水乙醇体积比为 2 : 3), Buffer RWB 在首次使用前, 请添加 49 ml 的无水乙醇 (Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7), 混合均匀后在瓶子上做好标记, 室温下保存。

*3: RNase Free Water 开启后建议保存于 -20°C。

*4: RNase Free Tubes 仅用于洗脱 RNA, 前期裂解所用离心管需自备。

实验前准备

1. 自备: 无水乙醇、1X PBS 缓冲液、氯仿 (或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303)、液氮、1.5 ml 离心管 (RNase free)。
2. Buffer RWA for small RNA 在首次使用前, 请添加 21 ml 的无水乙醇 (Buffer RWA for small RNA 与无水乙醇体积比为 2 : 3), Buffer RWB 在首次使用前, 请添加 49 ml 的无水乙醇 (Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7), 混合均匀后在瓶子上做好标记, 室温下保存。
3. 提前预冷离心机至 4°C。

保存及运输

保存温度: Package 2-1 4°C 保存

Package 2-2 室温 (15 ~ 30°C) 保存

运输温度: Package 2-1 室温 (15 ~ 30°C) 运输

Package 2-2 室温 (15 ~ 30°C) 运输

► 注意事项

1. 本试剂盒可从样本中提取 Small RNA (具体操作见<操作流程-Small RNA 纯化步骤>), 也可从样本中提取 Total RNA (包含 Small RNA; 具体操作见<操作流程-Total RNA 纯化步骤>)。
2. 应尽量使用新鲜的实验材料, 以确保样本中的 RNA 完整, 未被降解。
3. 使用液氮研磨组织材料时, 应随时加入液氮, 以确保研磨过程中 RNA 不被降解。
4. 组织材料切勿超过最大起始量 (动物组织为 50 mg; 植物组织为 100 mg; 培养细胞为 $1.0E + 07$ 个), 且要充分裂解, 避免堵塞 Small RNA Mini Columns, 影响 RNA 收量及纯度。如果样本量较大, 请适当增加试剂用量。
5. Small RNA Mini Columns 的最大容积为 700 μ l, 使用时如果液体的体积超出最大容积, 请分次加入: 上样 700 μ l 混合液后, 离心, 准确量取滤液至新的 1.5 ml 离心管中 (或弃滤液), 然后将剩余混合液再次上样, 重复此步骤; 或使用多个 Small RNA Mini Columns 进行纯化。
6. 操作过程中, Small RNA Mini Columns 的吸附柱需垂直从 Collection tubes 或 RNase Free Tubes 中取出 (或放入), 避免吸附柱柱头触碰管壁, 造成污染。
7. 操作过程中, 应预防 RNase 污染, 需注意以下几方面:
 - ① 使用 RNA 操作专用实验台, 经常更换新手套, 穿戴 RNA 专用实验服, 实验过程中尽量不要说话及来回走动, 操作过程中避免物品从离心管上方过。
 - ② 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的 RNase 污染。

► 推荐样本起始量及裂解液使用量

样本是否充分裂解是获得理想收量和纯度的关键。裂解液一定的情况下, 样本量过多会导致裂解不充分、堵塞纯化柱等问题, 最终导致 RNA 的收量及纯度降低。本试剂盒中样本的起始量及裂解液使用量可参考下表。如果样本量过大, 请增加 Buffer RLS for small RNA 的用量。

样本名称	样本起始量	Buffer RLS for small RNA 用量*
动物组织	≤ 50 mg	1 ml
植物组织	≤ 100 mg	1 ml
悬浮细胞	$\leq 1.0E + 07$ 个	1 ml
贴壁细胞	$\leq 1.0E + 07$ 个	1 ml

*: 按照此表中建议的 Buffer RLS for small RNA 用量进行实验需 2 次上柱离心, 或使用 2 个 Small RNA Mini Columns 进行纯化; 若样本起始量小于表格中最大推荐量, 为确保裂解充分, 建议不改变 Buffer RLS for small RNA 的用量, 按照表格中推荐添加; 若样本起始量大于表格中最大推荐量, 建议按照比例增加 Buffer RLS for small RNA 用量 (例如: 动物组织样本起始量为 100 mg, 则对应 Buffer RLS for small RNA 用量为 2 ml), 多次上柱离心, 或使用多个 Small RNA Mini Columns 进行纯化。

► 操作流程简图

Small RNA 纯化步骤



Total RNA (包含 Small RNA) 纯化步骤



➤ 操作流程

以下操作步骤根据推荐的最大样本起始量进行纯化

裂解步骤：

裂解完成后，根据需求选择 Small RNA 纯化【具体操作见 Small RNA 纯化步骤】或 Total RNA（包含 Small RNA）纯化【具体操作见 Total RNA（包含 Small RNA）纯化步骤】。

动物、植物组织的裂解：

1. 将新鲜或 -80°C 冻存的动物、植物组织样品转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨动物、植物组织（研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮），直至研磨成粉末状（无明显可见颗粒，研磨不充分会影响样本的收量）。
2. 将 50 mg 已研磨成粉末状的动物组织样本或 100 mg 已研磨成粉末状的植物组织样本转移至含有 1 ml 裂解液 Buffer RLS for small RNA 的 1.5 ml 离心管中，立即高速涡旋混匀或用移液枪反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。
【注：若裂解匀浆比较粘稠，可使用小号注射器抽打裂解液 5~10 次打断 DNA。针对柔软易裂解的组织样本，可以使用超低温匀浆器加入 1 ml Buffer RLS for small RNA 进行匀浆裂解。】
3. 将上述裂解液室温静置 2 min。
4. 12,000 rpm，4°C 离心 5 min，以去除组织碎片。
5. 小心吸取上清液至新的 1.5 ml 离心管（RNase free）。

悬浮培养的动物细胞的裂解：

1. 将细胞培养液以 1500 rpm，4°C 离心 5 min，将悬浮细胞收集至离心管底部，弃上清。
2. 向上述离心管中加入 1 ml 1×PBS，吹打混匀。
3. 将上述混合液转移至新的 1.5 ml 离心管中，8,000×g，4°C 离心 2 min，弃上清。
【注：应尽可能地除尽上清液，否则会影响裂解效果。】
4. 向收集了 1.0 E + 07 个培养细胞的离心管中加入 1 ml 的裂解液 Buffer RLS for small RNA。
5. 立即高速涡旋混匀或用移液枪反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。
【注：若裂解匀浆比较粘稠，可使用小号注射器抽打裂解液 5~10 次打断 DNA。】
6. 将上述裂解液室温静置 2 min。

贴壁细胞的裂解：

1. 吸弃细胞培养液，加入适量的 1×PBS，将细胞清洗一次。
2. 吸弃 PBS 洗液，向 1.0 E + 07 个培养细胞中加入 1 ml 的裂解液 Buffer RLS for small RNA，轻摇培养皿，确保 Buffer RLS for small RNA 溶液均匀分布于细胞表面。
【注：对于贴壁牢固的培养细胞可用细胞刮勺剥离细胞；处理速度需快，立即进行后续操作。】
3. 使用移液器反复吹打使细胞脱落，然后将内含细胞的裂解液转移至新的 1.5 ml 离心管中，高速涡旋振荡混匀或用移液器吹打直至裂解液中无明显沉淀。
【注：如裂解匀浆比较粘稠，可使用小号注射器抽打裂解液 5~10 次打断 DNA】
4. 将上述裂解液室温静置 2 min。

Small RNA 纯化步骤：

1. 向上述裂解液中加入 1/5 裂解液体积的氯仿（或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303），充分混合。室温静置 5 min。
2. 12,000 g 4°C 离心 15 min。小心取出离心管，此时匀浆液分为三层，即：上清液（含 Small RNA 和 Total RNA）、中间蛋白层及下层有机相。
【注：此步骤离心完后，可将离心机预热至室温。】
3. 准确量取上清液转移至另一新的 1.5 ml 离心管中（切勿吸出中间蛋白层），缓慢加入 0.47 倍上清液体积的无水乙醇（如：500 μl 的上清液加入 235 μl 无水乙醇），用移液枪吹打混匀，若出现明显粘稠物或沉淀，用移液枪吹打多次，打散沉淀，使其悬浮在溶液中。
【注：若沉淀不散会导致 Small RNA Mini Columns 堵塞，影响收量及纯度。】

4. 立即将上述混合液全部转移至 Small RNA Mini Columns 中, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃吸附柱, **准确量取滤液的体积**, 转移至新的 1.5 ml 离心管。
【注: Small RNA Mini Columns 的最大容积为 700 μ l, 转移时如果液体的体积超出最大容积, 请分次转移: 上样 700 μ l 混合液后, 离心, 准确量取滤液的体积, 转移至新的 1.5 ml 离心管, 然后将剩余混合液再次上样, 离心, 准确量取滤液的体积, 转移至上述离心管中, 弃吸附柱。】
5. 向上述离心管中缓慢加入 0.75 倍滤液体积的无水乙醇 (如: 700 μ l 的滤液加入 525 μ l 无水乙醇), 用移液枪吹打混匀, 若出现明显粘稠物或沉淀, 用移液枪吹打多次, 打散沉淀, 使其悬浮在溶液中。
【注: 若沉淀不打散会导致 Small RNA Mini Columns 堵塞, 影响收量及纯度。】
6. 立即将上述混合液全部转移至新的 Small RNA Mini Columns 中, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液, 保留吸附柱。
【注: 转移时如果液体的体积超出 Small RNA Mini Columns 的最大容积 (700 μ l), 请分次转移: 上样 700 μ l 混合液后, 离心, 弃滤液, 然后将剩余混合液再次上样, 重复此步骤。】
7. 向 Small RNA Mini Columns 中加入 600 μ l Buffer RWA for small RNA, 室温静置 2 min, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。
【注: 请确认 Buffer RWA for small RNA 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】
8. 向 Small RNA Mini Columns 中加入 650 μ l Buffer RWB, 室温静置 2 min, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。
【注: 请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】
9. 重复步骤 8。
10. 将 Small RNA Mini Columns 的吸附柱安置于新的 2.0 ml Collection Tube 上, 12,000 rpm 室温离心 2 min。
【注: 此步骤需竖直将吸附柱取出, 避免吸附柱柱头触碰收集管壁; 安装于新的 2.0 ml Collection Tube 上, 有利于提高 RNA 纯度。】
11. 将 Small RNA Mini Columns 转入一个新的 RNase Free Tube 上, 在吸附柱膜的中央处加入 15 μ l ~ 30 μ l RNase Free water, 室温静置 2 min, 然后 12,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱 Small RNA, 将溶解后的 Small RNA 放入 -80°C 中保存。
【注: 此步骤需竖直将吸附柱取出, 避免吸附柱柱头触碰 RNase Free Tube 管壁。】

Total RNA (包含 Small RNA) 纯化步骤:

1. 向上述裂解液中加入 1/5 裂解液体积的氯仿 (或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303), 充分混合。室温静置 5 min。
2. 12,000 g 4°C 离心 15 min。小心取出离心管, 此时匀浆液分为三层, 即: 上清液 (含 Small RNA 和 Total RNA)、中间蛋白层及下层有机相。
【注: 此步骤离心完后, 可将离心机预热至室温。】
3. 准确量取上清液转移至另一新的 1.5 ml 离心管中 (切勿吸出中间蛋白层), 缓慢加入 1.5 倍上清液体积的无水乙醇 (如: 500 μ l 的上清液加入 750 μ l 无水乙醇), 用移液枪吹打混匀, 若出现明显粘稠物或沉淀, 用移液枪吹打多次, 打散沉淀, 使其悬浮在溶液中。
【注: 若沉淀不打散会导致 Small RNA Mini Columns 堵塞, 影响收量及纯度。】
4. 立即将上述混合液全部转移至新的 Small RNA Mini Columns 中, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。
【注: 转移时如果液体的体积超出 Small RNA Mini Columns 的最大容积 (700 μ l), 请分次转移: 上样 700 μ l 混合液后, 离心, 弃滤液, 然后将剩余混合液再次上样, 重复此步骤。】
5. 向 Small RNA Mini Columns 中加入 600 μ l Buffer RWA for small RNA, 室温静置 2 min, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。
【注: 请确认 Buffer RWA for small RNA 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】
6. 向 Small RNA Mini Columns 中加入 650 μ l Buffer RWB, 室温静置 2 min, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。
【注: 请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】
7. 重复步骤 6。
8. 将 Small RNA Mini Columns 的吸附柱安置于新的 2.0 ml Collection Tube 上, 12,000 rpm 室温离心 2 min。
【注: 此步骤需竖直将吸附柱取出, 避免吸附柱柱头触碰收集管壁; 安装于新的 2.0 ml Collection Tube 上, 有利于提高 RNA 纯度。】
9. 将 Small RNA Mini Columns 转入一个新的 RNase Free Tube 上, 在吸附柱膜的中央处加入 15 μ l ~ 30 μ l RNase Free water, 室温静置 2 min, 然后 12,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱 Total RNA (包含 Small RNA), 将溶解后的 Total RNA (包含 Small RNA), 放入 -80°C 中保存。
【注: 此步骤需竖直将吸附柱取出, 避免吸附柱柱头触碰 RNase Free Tube 管壁。】