

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 收量高, 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、1×PBS 缓冲液、氯仿 (或 1-溴-3-氯丙烷)、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 的吸附柱需竖直从 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

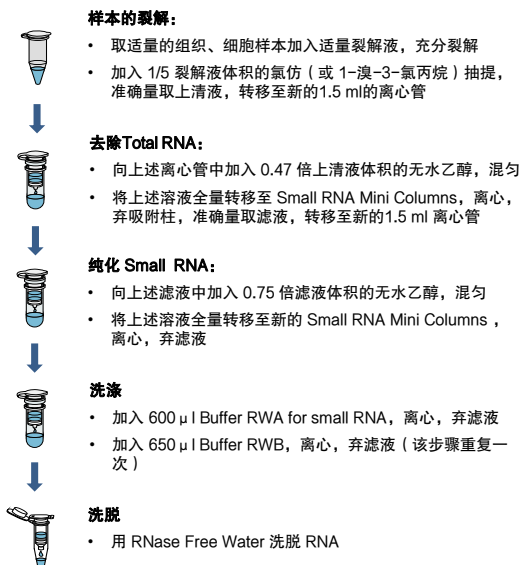
样本是否充分裂解是获得理想收量和纯度的关键。裂解液一定的情况下, 样本量过多会导致裂解不充分、堵塞纯化柱等问题, 最终导致 RNA 的收量及纯度降低。本试剂盒中样本的起始量及裂解液使用量可参考下表。如果样本量过大, 请增加 Buffer RLS for small RNA 的用量。

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

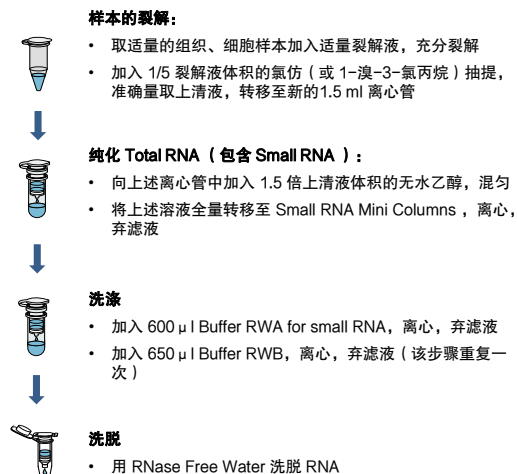
*: 按照此表中建议的 Buffer RLS for small RNA 用量进行实验需 2 次上柱离心, 或使用 2 个 Small RNA Mini Columns 进行纯化; 若样本起始量小于表格中最大推荐量, 为确保裂解充分, 建议不改变 Buffer RLS for small RNA 的用量, 按照表格中推荐添加; 若样本起始量大于表格中最大推荐量, 建议按照比例增加 Buffer RLS for small RNA 用量 (例如: 动物组织样本起始量为 100 mg, 则对应 Buffer RLS for small RNA 用量为 2 ml), 多次上柱离心, 或使用多个 Small 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 $1\times$ PBS, 吹打混匀。
3. 将上述混合液转移至新的 1.5 ml 离心管中, $8,000\times g$, 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 1.0×10^7 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 $1\times$ PBS, 将细胞清洗一次。
2. 吸弃 PBS 洗液, 向 1.0×10^7 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 1-溴-3-氯丙烷), 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: 若沉淀不打破会导致 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 $^{\circ}$ 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 1-溴-3-氯丙烷), 充分混合。室温静置 5 min。
2. 12,000 g 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。】