



miRcute miRNA提取分离试剂盒 (DP501) 操作指南 ——动物组织miRNA的提取

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170524

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. 动物组织样本
2. 研磨器或液氮，研钵
3. 无水乙醇，氯仿
4. 移液器及配套RNase-Free无菌枪头（200 μ l， 1ml）； 1.5 ml， 2.0ml 离心管（RNase-free）
5. 涡旋振荡器，台式低温离心机

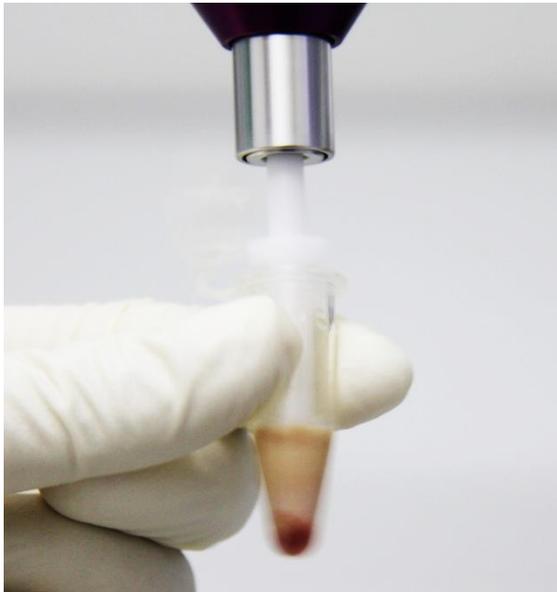


实验准备-试剂盒准备

第一次使用前应在去蛋白液RD、漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。



Step 1



将组织中加入少于150 μ l 的裂解液MZ
用研磨器匀浆成无明显团块，或在研
钵中用液氮充分研磨。



每50–100 mg组织补加裂解液
MZ至1 ml 并迅速混匀

注意：样品体积不应超过裂解液 MZ体积(1 ml)的十分之一。

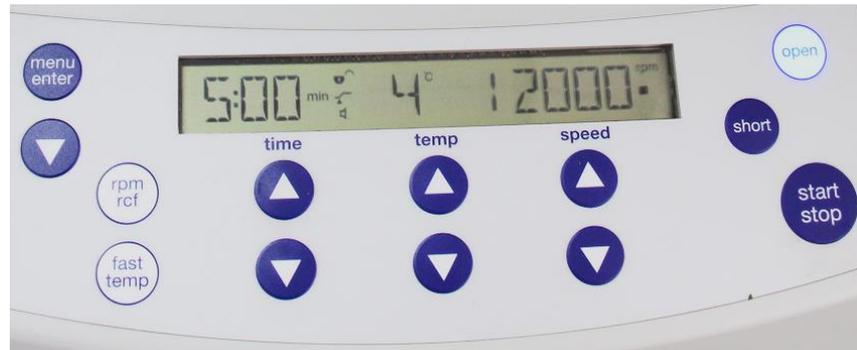
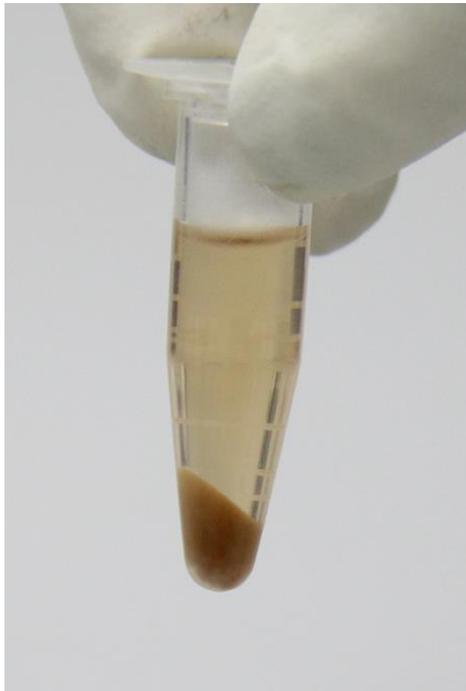
Step 2



将匀浆样品在15–30°C放置5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

Step 3 (可选步骤)

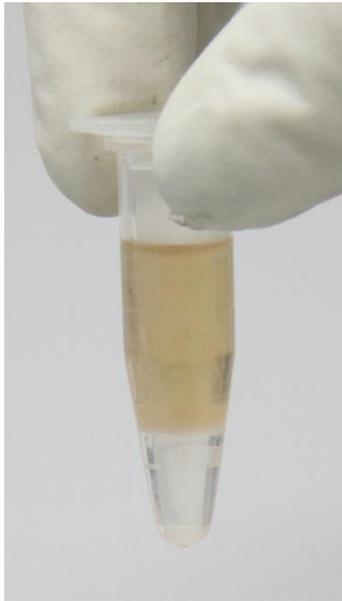
如果样品中含有较多蛋白、脂肪、多糖或肌肉部分等，可加此步骤离心去除。



4°C 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心5 min，
取上清，转入一个新的无RNase的离心管中。

离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高
分子量DNA，RNA存在于上清溶液中。

Step 4



加入200 μ l 氯仿

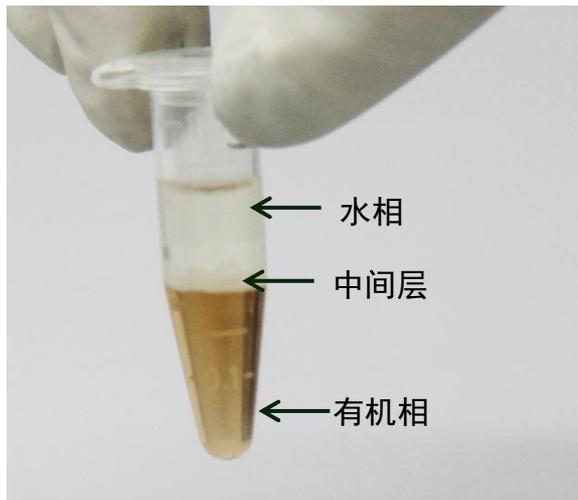


盖好管盖，
剧烈振荡15 sec



室温放置5 min

Step 5



4°C 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心15 min,



把水相转移到新管中，进行下一步操作。
水相的体积约为所用裂解液MZ试剂的50%

注意：小心吸取水相，不要吸到中间层

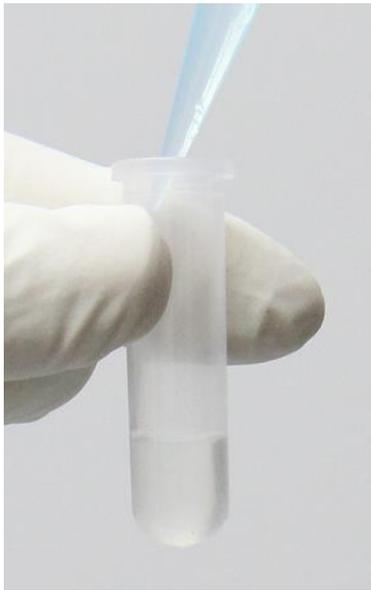
Step 6



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 μ l 的转移液加215 μ 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（若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱，请分两次转入），室温 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心30 sec。
离心后弃掉向吸附柱miRspin，保留流出液。

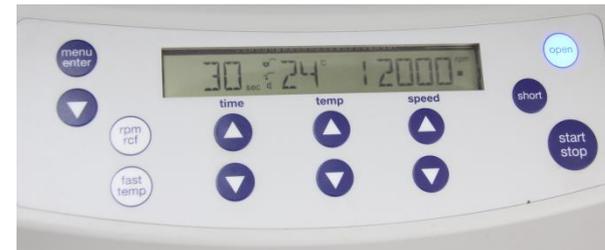
Step 7



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 μ l 的流出液加525 μ 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miRelute中（若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱，请分两次转入），室温 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心30 sec，**离心后弃掉流出液，保留吸附柱miRelute。**

Step 8



向吸附柱miRelute中加入500 μ 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 (~13,400 \times g)离心30 sec, 弃废液。

Step 9 and 10



向吸附柱miRelute中加入500 μ l漂洗液RW（请先检查是否已加入乙醇）

室温静置2 min，室温 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液。

Step 10: 重复操作步骤 9 一次

Step 11



将吸附柱miRelute放入2 ml收集管中，室温 12,000 rpm (~13,400×g)离心1 min，去除残余液体。

此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后打开盖子将吸附柱miRelute在室温，或置于超净工作台上通风片刻，将乙醇挥发。**漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。**

Step 12



将吸附柱miRelute转入一个新的RNase-Free 1.5 ml离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加15-30 μ l RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，室温 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心2 min。

洗脱缓冲液体积不应少于15 μ l，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70 $^{\circ}$ C，以防降解。

如果想提高RNA得率，可重复上步操作一次。

Tips

- 如果样本量较少或miRNA丰度较低，可选择提取total RNA的实验方案，提取的得率较高。
- 对于血清/血浆样本miRNA的提取，提高裂解液MZ的使用量可增加miRNA得率。最大比例不能超过1：5（样本体积：MZ体积）。血清/血浆样本建议采用total RNA的提取方案。