

Plant miRNA Kit (Polysaccharides & Polyphenolics-rich)

多糖多酚植物 miRNA 提取试剂盒

目录号: RNE73

试剂盒组成

Component	RNE73 (50 preps)
Buffer HL	50 ml
Buffer miRW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml
RNase-free H ₂ O	10 ml
Spin Columns RA with Collection Tubes	50
Spin Columns miRA with Collection Tubes	50

保存方法

室温（15-30℃）。

产品介绍

本试剂盒可从植物组织，特别是富含多糖多酚或淀粉的植物组织（如棉花叶片，马铃薯块茎，苹果，桃树叶片等）中快速提取包含 miRNA 的总 RNA，可同时处理大量不同样品。提取的总 RNA 纯度高，没有蛋白和其它杂质的污染，可用于 RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

实验前准备及重要注意事项

1. 需自备无水乙醇和 β -巯基乙醇。
2. 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. Buffer HL 和 Buffer miRW1 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或生理盐水冲洗。
4. 第一次使用 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。

操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

Protocol A: 总 RNA 的提取

提取的总 RNA 包括 miRNA 等其他<200 nt 的小分子 RNA，对 miRNA 的纯度要求不高时，比如在研究 miRNA RT-PCR、miRNA Northern blot 时也可以采用此方法。

1. 取 600 μ l Buffer HL 至 1.5 ml 离心管中备用。

注意：通常情况下无需使用 β -巯基乙醇。针对多酚含量非常高的样本，可在裂解液中加入 β -巯基乙醇至 5%，如 570 μ l Buffer HL+30 μ l β -巯基乙醇， β -巯基乙醇可防止 RNA 降解。

2. 匀浆处理：50-100 mg 组织在液氮中迅速研磨成粉末，立即转入装有 Buffer HL 的离心管，剧烈振荡混匀，彻底匀浆，不要有聚集成团的组织块。

注意：1）对于果肉类等含水量极其丰富的材料，可以适当多加入些组织，最多可增加至 200 mg；对于富含淀粉的样本或成熟叶片，可适当增加 Buffer HL 的用量，最多可增加至 800 μ l。2）由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的 RNA 含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

3. 12,000 rpm（ $\sim 13,400\times g$ ）离心 3 min，小心吸取上清到一个新的离心管。

4. 向步骤 3 得到的溶液中加入 1.5 倍上清体积的无水乙醇，颠倒混匀（可能会出现沉淀，不影响后续操作），将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RA）中，若一次不能将全部溶液加入吸附柱，请分两次转入，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液，将吸附柱 RA 重新放回收集管中。

5. 向吸附柱 miRA 中加入 700 μ l Buffer miRW1，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

6. 向吸附柱 miRA 中加入 600 μ l Buffer RW2（使用前检查是否加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

7. 重复步骤 6。

8. 将吸附柱 miRA 放回空收集管内，12,000 rpm 离心 2 min。

注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

9. 将吸附柱 miRA 放入新的 RNase-free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 30-40 μ l RNase-Free H₂O，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 miRNA 溶液，-70℃保存。

注意：RNase-Free H₂O 体积不应少于 30 μ l，体积过小影响回收效率。如需提高终浓度，可将洗脱的 miRNA 溶液再次加入到吸附柱中二次洗脱。

Protocol B: miRNA 富集提取

富集的 miRNA 去除了较大片段的 mRNA 和 rRNA 等，对 miRNA 的纯度要求较高时，比如在研究 miRNA 芯片、miRNA 克隆时建议采用此方法。

1~3 步骤同 protocol A。

4. 向步骤 3 得到的溶液中加入 **0.43 倍上清体积的无水乙醇**，混匀（此时可能会出现絮状沉淀），将得到的溶液和可能出现的絮状沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 RA（Spin Columns RA）中。12,000 rpm 离心 1 min，离心后弃掉吸附柱 RA，**保留滤液（计算滤液体积，miRNA 在滤液中）**。

注意：一些富含多糖的组织粘稠度高，容易堵塞柱子，此时可以提高离心力（如 20,000 ×g），确保液体全部穿过，膜上无残留。

5. 向步骤 4 得到的**滤液**中加入 **0.75 倍滤液体积的无水乙醇**，混匀。将得到的溶液转入已装入收集管的吸附柱 miRA（Spin Columns miRA）中。若一次不能将全部溶液加入吸附柱，请分两次转入。12,000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 miRA 重新放回收集管中。

6. 向吸附柱 RA 中加入 **700 μl Buffer miRW1**，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

7. 向吸附柱 RA 中加入 **600 μl Buffer RW2**（使用前检查是否加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

8. 重复步骤 7。

9. 将吸附柱放回空收集管内，12,000 rpm 离心 2 min。

注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

10. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 **30-50 μl RNase-Free H₂O**，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液，-70℃保存。

注意：RNase-Free H₂O 体积不应少于 30 μl，体积过小影响回收效率。如需提高终浓度，可将洗脱的 RNA 溶液再次加入到吸附柱中二次洗脱。
