

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 (使用前按瓶上标签加入无水乙醇) |
| 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°C)。

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。

-
5. **Buffer HL** 在使用前请加入 β -巯基乙醇至终浓度 2%，如 588 μ l Buffer HL 加 12 μ l β -巯基乙醇，加入 β -巯基乙醇的 Buffer HL 室温可保存 1 个月。

操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

Protocol A: 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. 取 600 μ l Buffer HL（使用前请确认是否已加入 β -巯基乙醇）至 1.5 ml 离心管中备用。
 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，小心吸取上清液到一个新的离心管。（**量取溶液体积**）。
 4. 向步骤 3 得到的溶液中加入 **0.43 倍体积的无水乙醇**，混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 RA（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 1 min，离心后弃掉吸附柱 RA，保留流出液（**合并两次流出液，计算体积**）。
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 \times g），确保液体全部穿过，膜上无残留。
 5. 向步骤 4 得到的溶液中加入 **0.75 倍体积的无水乙醇**，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，请分多次转入。室温 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 miRA 中加入 **700 μ l Buffer miRW1**，室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
 7. 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！），室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
 8. 重复步骤 7。
 9. 将吸附柱 miRA 放回空收集管内，室温 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 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，室温 12,000 rpm 离心 1 min，得到 miRNA 溶液，-70°C 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: 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。

1~3 步骤同 protocol A。

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，请分多次转入，室温 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 RA 中加入 **700 μ l Buffer miRW1**，室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
6. 向吸附柱 RA 中加入 **600 μ l Buffer RW2**（使用前检查是否加入无水乙醇！），室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
7. 重复步骤 6。
8. 将吸附柱放回空收集管内，室温 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 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 μ l RNase-Free H₂O**，室温放置 2 min，室温 12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液，-70°C 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 RNA 溶液再次加入到吸附柱中二次洗脱。