
版本号:220312

AidQuick miRNA PAGE Extraction Kit
聚丙烯酰胺凝胶 miRNA 回收试剂盒

目录号: DR07

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (DR0701)
平衡液	室温	5ml
结合液 MRB	室温	40 ml 第一次使用前按说明加指定量异丙醇
缓冲液 DB	室温	30ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
吸附柱 EC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

按照指定温度储存, 12 个月内不影响使用效果。

储存事项: 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍:

本试剂盒采用新型硅基质膜离心柱及特殊的缓冲液系统, 可从聚丙烯酰胺凝胶中简捷高效回收 200 nt 以下的小片段 RNA, 尤其是 20 nt 左右的 microRNA(miRNA)分子。回收效率可高达 85%。并可最大限度去除杂质, 获得高纯度的 RNA, 所得到的 DNA 可直接用于反转录、miRNA 测序建库等后续分子生物学试验。

❖ 产品特点：

1. 可以回收 15-3000 nt 范围内的各种长度的 RNA, 包括 100 nt 以下的 miRNA 片段。
2. 使用了优质结合液, 不含传统结合液的碘化钠和高氯酸盐, 不抑制回收后反转录、测序建库等下游反应。
3. 独特的配方保证了该试剂盒比一般试剂盒回收效率大大提高。
4. 快速、方便离心柱型, 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀。

❖ 注意事项

1. 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机。
2. 结合液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, 要立即用大量清水或者生理盐水冲洗。**
3. 电泳时最好使用新的电泳缓冲液, 以免影响电泳和回收效果。
4. 切胶时, 紫外照射时间应尽量短, 以免对RNA造成损伤。也可以选择可见光染料染色后在可见光下切胶会避免紫外对RNA损伤。
5. 回收率与片段大小、凝胶浓度、初始RNA量和洗脱体积有关。

❖ 关于平衡液的使用

1. **介绍:** 核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37℃ 使沉淀完全消失。
2. **使用方法:** 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100 μ l 的平衡缓冲液至柱子中。13,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

❖ 操作步骤

提示:

⇒ 第一次使用前请先在 Binding Buffer 瓶中加入指定量**异丙醇!**

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 中加入指定量无水乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入!

1. 切取含 RNA 片段的 PAGE 凝胶 (100 mg 左右，尽可能多地把多余的胶切除，否则会影响回收效率)，放入 1.5 mL 离心管中，用移液枪头尽可能捣碎 (最好先在酒精灯上将枪头的口烧密闭再用于捣碎)，捣得越细越好。
2. 向凝胶中加入 1-2 倍体积的缓冲液 DB (如 100mg 凝胶加入 100-200 μ l 缓冲液 DB)，55℃ 温浴 30 分钟-2 小时，期间每 15 分钟涡旋震荡混匀，促进胶中 RNA 扩散到溶液中。

一般来说，回收片段越大，RNA 扩散需要的时间越长，小于 100 nt 左右的 RNA 片段温浴 30 分钟就可以 (时间长些也不影响回收效果)；如果回收 RNA 片段较大，可以将温浴时间适当延长。

3. 13,000 rpm 离心 5 分钟。小心取上清转入新的离心管。记录上清体积。
4. 加入 9 倍上清体积的结合液 MRB，混匀。

回收片段 > 200 nt 时，加 5 倍上清体积的结合液 MRB 即可。

平衡液预处理吸附柱：

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

5. 将上一步所得溶液加入吸附柱 EC 中（吸附柱放入收集管中），室温放置 1 分钟，13,000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。
吸附柱最大容积为 750 μ l，若溶液体积大于 750 μ l，可分批加入。
6. 加入 500 μ l 漂洗液 RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
7. 重复步骤 6 一遍。
8. 将吸附柱 EC 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
9. 取出吸附柱 EC，放入一个干净的离心管中，**在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l RNase-free H₂O**，室温放置 2 分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟。如果需要较高浓度核酸，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，离心 1 分钟。
洗脱体积越大，洗脱效率越高。如果需要核酸浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 25 μ l，体积过小降低核酸洗脱效率，减少产量。