

3. 预防 RNase 污染, 在实际的操作中应遵循以下指南 (参见《分子克隆》)
 - * 全程佩戴一次性手套。皮肤经常带有细菌和霉菌, 可能污染RNA的抽提并成为 RNA 酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。
 - * 使用灭菌的、一次性的塑料器皿和自动吸管抽提RNA, 避免使用公共仪器所导致的RNA酶交叉污染。
 - * 使用无 RNA 酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在 150°C 的烘箱中烘烤 4 小时, 塑料器皿可以在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟, 用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。
4. 考虑到环保问题, 本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿, 用户使用前需要自备氯仿。
5. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析大 RNA 的质量。好的 RNA 产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体 RNA 带, 分别为~5Kb (28S), ~2Kb (18S), 条带亮度比值约为 2: 1。
6. 检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 吸光度比值时, RNA 样品应该溶于 TE 后检测, 如果用水稀释后检测, 由于一般水离子强度和 PH 值低, 会使 OD₂₈₀ 升高, 从而使比值降低。
7. 加入裂解液 MRL 匀浆后, 加氯仿前, 样品可在 -60°C-70°C 保存一个月以上。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇!

1. 匀浆处理

a. 组织

用玻璃或强力匀浆器搅匀组织样品, 保存于液氮内样品需要用研钵磨碎, 每50~100mg 组织加1ml的裂解液MRL后匀浆。组织样品容积不能超过MRL容积的10%。

b. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入1ml的MRL溶解细胞, 并用移液枪轻轻吹打混匀。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的MRL量 (每10cm²加1ml)。一般情况下, 普通大小的细胞培养瓶, 加入1ml的MRL, 迅速轻摇使MRL充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活RNA酶, 轻轻用移液枪反复吹打混匀。当MRL量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

c. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在MRL试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。每5~10×10⁶的动物细胞, 植物或酵母菌细胞或每1×10⁷细菌加1ml的MRL。在加入MRL前应避免洗涤细胞, 否则会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

d. 生物液体

每0.25ml液体样品(血清, 血浆, 脑脊液等等)加入0.75ml 裂解液MRL, 用加样枪吹打液体样品几次以帮助裂解样品中细胞。每5~10×10⁶个细胞至少加入0.75ml裂解液MRL。裂解液MRL和液体样品的终体积比总是3: 1。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀, 在 15-30°C 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。

3. **可选步骤:** 4°C 的条件下 12,000rpm 离心 10 分钟, 小心取上清转入一个新的 RNase free 的离心管中。

4. 每 1mlMRL 加 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖, 剧烈振荡 15 秒并将其在 0

室温下孵育 3 分钟。

5. 于4℃12,000rpm 离心10分钟，样品会分成三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相，RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加MRL体积的60%，把水相转移到新管中，进行下一步操作。
6. 加入 0.6 倍体积 70%乙醇（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），颠倒混匀（此时可能会出现沉淀）。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中（吸附柱套在收集管内）。
7. 10,000rpm 离心 45 秒，收集下滤液（下滤液中含有 microRNA），准确估计下滤液的体积（**准确性非常重要**），加入 2/3 倍体积的无水乙醇，颠倒几次混匀，将混合液倒入到吸附柱 RB 中（吸附柱 RB 容量约为 700μl，所以要分几次离心加入同一吸附柱），10,000rpm 离心 30 秒弃掉废液。
注：如果要分离大 RNA（18s 和 28s），也可以从吸附柱 RA 中按照以下步骤得到。
8. 加入 700μl 漂洗液 RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
9. 加入 500μl 漂洗液 RW，12,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
10. 将吸附柱 RB 放回空收集管中，12,000 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。
11. 取出吸附柱 RB，放入一个 RNase free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-80μl RNase free water（事先在 65-70℃ 水浴中加热效果更好），室温放置 2 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

收集得到纯净 microRNA 保存于 -20℃ 或者更低。

二、原理简介

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后总 RNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free water 将纯净 RNA（microRNA）从硅基质膜上洗脱。

三、试剂盒特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的 MRL 裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。

四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分!）

1. 为防止RNA降解，所有离心步骤如未加说明，均在4℃低温进行。使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
 2. 裂解液 MRL 中含有刺激性有害化合物，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，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
-