

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. 将石蜡包埋的组织切成 5-10 μm 的薄片后置于 1.5ml 离心管中。建议上样量: 石蜡组织块大的 10um 切 5 片, 组织小的 10um 切 10 片。
2. 加入 1ml 二甲苯, 涡旋振荡 10 秒。
3. 室温 12,000rpm 离心 2min。去掉上清液, 小心不要去掉沉淀。
4. 加入 1ml 无水乙醇, 涡旋混匀, 室温 12,000rpm 离心 2min。
5. 去掉上清液, 小心不要去掉沉淀。室温晾干 10min 或直至残留的乙醇已挥发完全。
6. 加入 240μl 溶液 PTL 和 10μl 蛋白酶 K 溶液, 涡旋混匀。55°C 孵育 15min, 再 80°C 15min。
7. 加入 750μl 裂解液 MRL, 涡旋混匀, 室温放置 2min。
8. 加入 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖, 剧烈振荡 15 秒并将其在室温下孵育 3 分钟。
9. 于 4°C 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。把水相 (约 600μl) 转移到新管中, 进行下一步操作。
10. 加入等体积 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, 溶液太多可分次过柱)。
11. 10,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液, 将吸附柱重新套回收集管。
12. 加 500μl 去蛋白液 RE, 12,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液。
13. 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。

14. 加入 500 μ l 漂洗液 RW, 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。
15. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 掀开离心柱盖, 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。
16. 取出吸附柱 RA, 放入一个 RNase free 离心管中, 加入 30 μ l RNase free water (事先在 65-70 $^{\circ}$ C 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 RNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C 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 在高离序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 $^{\circ}$ C 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。