microRNA 快速提取试剂盒

目录号：EN015-50

❖ 适用范围：

适用于快速提取动物、植物、昆虫、细胞等样品的miRNA和其它各种小RNA。可以一次性把mRNA、tRNA、rRNA、microRNA都提出来，用去做全转录组测序，或者用于做microRNA的反转录、qPCR检测；也可以一次性把microRNA和总RNA（mRNA、tRNA、rRNA）分别提出来。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(R015-50)
RNAzol	4°C 避光	50 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H_2O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
Wash Solution 1	室温	12 ml *第一次使用前加入 28ml 无水乙醇*
Wash Solution 2/3	室温	10 ml *第一次使用前加入 42ml 无水乙醇*
RNase-free H_2O	室温	10 ml
RNA 吸附柱和收集管	室温	50 套
microRNA 吸附柱和收集管（选购）	室温	50 套

本试剂盒室温下（15℃-25℃）储存 12 个月不影响使用效果。RNAzol 4℃ 最佳。

❖ 实验前准备

1. **需自备：无水乙醇，氯仿，研钵。**
2. **无酶离心管，无酶蓝/黄/白吸头。**

❖ 操作步骤：（提取包含 microRNA 的总 RNA）

提示：

第一次使用前请先在 70%乙醇、Wash Solution 1 瓶和 Wash Solution 2/3 瓶中加入指定量乙醇！加入后请及时打钩标记，以免多次加入!

❖ **所有的离心步骤均可在室温（15°C-25°C）完成。**

1. A. 动物组织

新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块,根据处理组织的质量，按照 50-100mg 加入 1ml 的比例加入 RNAzol 后电动或者手动彻底匀浆。或者在液氮中研磨组织成细粉后，取适量组织细粉（约 50-100mg）转入装有 1ml RNAzol 的 1.5ml 离心管中,剧烈吹打涡旋混匀。**下接操作步骤 2**。

B. 植物组织

用少量液氮预冷研钵，取适量植物组织放入研钵，在液氮中将其研磨成细粉后，取 50-100mg 细粉转入 1.5ml 离心管，加入 1ml 裂解液 RNAzol, 立即用手剧烈振荡 20 秒充分裂解（电动匀浆或者旋涡震荡效果更佳）。**下接操作步骤 2**。

C. 贴壁细胞

对于贴壁细胞，孔板培养和细胞瓶培养可以直接裂解，尽可能吸干净所有培养液残留后直接加入 1ml 的 RNAzol, 迅速轻摇使 RNAzol 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，**下接操作步骤项下 2**。

D. 悬浮细胞

a) 对于悬浮细胞，收集<10^7 悬浮细胞到一个 1.5ml 离心管。

b) 12，000rpm 离心 10 秒，使细胞沉淀下来。**完全吸弃上清**，留下细胞团，**注意：**

不完全弃上清，会稀释裂解液，导致产量纯度降低。

c) 轻弹管壁将细胞沉淀**完全松散重悬**，加入 1ml RNAzol，涡旋或者吹打，充分裂解混匀。

d) **下接操作步骤 2**。

2. 室温放置 5 分钟以充分分离核酸蛋白复合物。

3. （**可选步骤**）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。（当样品富含蛋白质、脂肪、多糖，或富含细胞外物质，例如肌肉、脂肪组织，或植物的块茎部分时可能需要一额外的离心步骤。离心后的沉淀中包含有细胞外膜、多糖、以及高分子量 DNA，而上清中含有 RNA。）

4. 加入 200µl 氯仿，剧烈振荡 15 秒。

5. 室温放置 3 分钟，12，000rpm 离心 10 分钟。

6. 小心取上清（约 600µl）转入到新的离心管，加入 1.5 倍体积的无水乙醇（必须是室温的，通常 900µl），涡旋混匀。此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程,立即吹打混匀,不要离心，立刻接下步。

7. 将混合物(每次小于 700µl，多可以分两次加入)加入一个 RNA 吸附柱中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 1 分钟，弃掉废液。

8. 加 700µl 700µl Wash Solution 1（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12，000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

9. 加入 500µl Wash Solution 2/3（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

10. 重复步骤 9。

11. 将 RNA 吸附柱放回空收集管中，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。

12. 取出 RNA 吸附柱，放入一个新的 1.5ml 离心管（RNase-free）中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中央部位悬空滴加 30-50µl RNase-free H_2O（事先在 100℃水浴中预

热效果更好）， 室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

附：microRNA 富集方法（仅仅提取 microRNA，不包含>200 nt 其它总 RNA 成份。）

1. 按照前面标准操作步骤 1－5 操作，直到得到上清。
2. 较精确估计上清体积（约 600µl），加入等体积 70％乙醇（**请先检查是否已加入无水乙醇!**）（必须是室温的），涡旋或者吹打充分混匀，不要离心。
3. 将混合物加入一个 RNA 吸附柱中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 60 秒，**收集滤过物。**将滤过物从收集管转移到一个新的离心管后，把吸附柱子放回空的收集管内，再加入剩下的混合物，离心，**收集滤过物。合并两次滤过物**，计算体积。

   此时，滤过物含有 microRNA, 吸附柱子上面是除去了 microRNA 的总 RNA（不包含 microRNA），如果需要，可以按照前面标准操作步骤 8－12 操作漂洗，洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。
4. 较精确估计**滤过物体积**，加入 0.65 倍体积无水乙醇（必须是室温的），涡旋或者吹打充分混匀，不要离心。
5. 取一套新的 **microRNA 吸附柱**，将上一步骤混合物(每次小于 700µl,多可以分两次加入)加入 **microRNA 吸附柱**中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
6. 按照前面标准操作步骤 8－12 操作漂洗，洗脱得到富集的 microRNA。

注意：不同的实验可以选择不同的方法，例如Northern Blot或者表达芯片谱分析可以选择提取包括microRNA的总RNA。富集方法提取的microRNA因为去除了较大片段的mRNA和rRNA等，可能减少某些下游试验的扩增背景，当背景较高或者非特异扩增较多时，可以尝试使用富集方法提取的microRNA。