

RNA Extraction Protocol

RNA 相关操作都需围绕着一主线，即保护 RNA 的完整性，使 RNA 免受 RNase 的酶解。围绕这条主线，要关注 RNase Free 工作环境的建立、反应中 RNase Free 条件的保持、RNA 电泳及结果分析等一系统的细节问题。所有 RNA 相关操作，均需要时刻注意 RNase Free。主要包括冰上操作、试剂耗材 RNase Free、戴口罩、勤换手套。

mirVana™ miRNA Isolation Kit 抽提 RNA

利用该试剂盒可以抽提 total RNA (包括完整的小 RNA)，也可以将小于 200nt 的小 RNA 单独提出来。总过程请仔细看懂试剂盒配套 protocol。以下列出大致流程以及注意事项。

一、准备工作

1. 试剂盒、Acid-Phenol: Chloroform、冰；
2. RNase Free 1.5 mL 或者 0.5 mL EP 管，移液器以及 RNase free tips；
3. 新使用的试剂盒需准备 100%乙醇，加入 21 mL 100%乙醇到 miRNA Wash Solution 1，40ml 100%乙醇到 miRNA Wash Solutionn 2/3，充分混匀，两个瓶上都需打勾标注；
4. 用 75%酒精擦拭实验台以及移液器；
5. 将含 RNase Free ddH₂O 的 EP 管放入 95°C 金属浴中。

二、操作步骤

1. 细胞以及组织的保存与处理：

运输、保存组织细胞可使用 RNAlater，根据样本大小确定使用 RNAlater 的体积以保证完全渗透组织细胞，大块组织建议切成小块。最好使用 1.5ml RNase free EP 管装样品冻于-80°C，冻存管液氮保存样品的话，若需要离心去除 RNAlater 抽 RNA 时，会发现冻存管大小不适合离心机规格；条件允许

的情况下，可以直接用裂解液（抽 RNA 试剂盒中的 lysis buffer、Trizol）保存样品，冻入-80°C。

2. 组织细胞裂解：

组织细胞经过预冷 PBS 清洗后，依据细胞量以及组织大小加入适量 lysis buffer，具体体积 300-1500 μ L 不等，主要决定于组织细胞量。一般在冰上裂解，若组织细胞非常难裂解，可以放于室温，并注意定时颠倒摇晃促进裂解
注意：裂解期间观察裂解情况，可逐步看见组织细胞融化掉。裂解后的样品一般来回颠倒时会发现液体比较黏着，建议拿 10ml 的注射器来回抽打挤压直至液体不再那么黏着。

3. 加入 lysis buffer 1/10 体积的 Homogenate Additive，混匀，冰上放 10min；
4. 用与 lysis buffer 相同体积的配套 RNA 专用酸性酚氯仿抽提。加入后反复震荡混匀；
5. 离心分层后将上清小心移入新的 EP 管，吸上清的时候最好拿 200 μ L 量程的枪，在好的灯源环境下，很小心的一枪一枪的吸，不要吸到管壁上的白色物质以及下面的有机溶剂。记录吸出的上清体积；
6. 加入吸出上清体积 1.25 倍的无水乙醇，混匀；
7. 将混合液过柱子，一次最多能过 700 μ L，超出部分在上一个 700 μ L 离心后继续加入过柱；
8. 用 700 μ L 的 wash solution 1 清洗柱子；
9. 再用 500 μ L Wash Solution 2/3 清洗柱子，并重复清洗一遍；
10. 将柱子换到新管中，用 95°C 预热的 RNA Free 的去离子水滴到柱子中央，再离心离心速度及时间。如果抽的 RNA 量特别少，建议减小 95°C 的 RNA Free 的去离子水的体积。