

一般实验室使用，仅用于 *体外*

石蜡包埋组织microRNA快速提取试剂盒（离心柱型）

用于快速提取各种动植物细胞/组织高纯度microRNA

目录号：RP5311（50次） RP5312（100次）

使用手册

2010年9月，第3版



北京百泰克生物技术有限公司
BioTeke Corporation

地 址：北京海淀区留学人员创业园

电 话：010-62951781

传 真：010-62951781

网 址：www.bioteke.com

Email: info@bioteke.com



北京百泰克生物技术有限公司
Bioteke Corporation

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50 次 (DP5311)	100 次 (DP5312)
溶液 PTL	室温	15ml	30ml
蛋白酶 K	-20℃	1ml	1ml×2
裂解液 MRL	4℃避光	55 ml	55 ml×2
漂洗液 RW	4℃ (一个月)	15 ml	25 ml
	-20℃ (长期)	第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	20 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O	18ml RNase-free H ₂ O
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个	100 个
RNase-free 吸附柱 RB	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

注意事项

- 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，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
- 不合适的储存于低温（4℃或者-20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃-25℃）进行。裂解液 MRL 可以常温运输，收到后 4℃避光保存。
- 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。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
RNA产量低	样品裂解或者匀浆不彻底	样品太厚，蛋白酶 K 活性降低
	使用的样品或者裂解物在 -20℃或者-70℃存放太久	存放时间过长可能降低 RNA 产量，应尽快处理样品或者裂解物。
	组织本身含 RNA 少	不同类型的组织和细胞含有不同量的 RNA,对于含量少的组织应该适当提高起始处理量。
	超过了吸附柱的最大吸附能力	同一个样品使用多个吸附柱，然后合并得到 RNA。
	漂洗液 RW 内忘记加乙醇	第一次实验时，漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇。
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ 吸光度比值<1.6	分光光度计检测吸光度时，RNA样品不是溶于 TE，而是溶于水。低离子浓度和低 pH 条件下，OD ₂₈₀ 值会较高，造成比值低。	检测时用 TE 稀释样品
	污染了蛋白或者苯酚	做步骤 9 吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相和下层有机相
基因组DNA污染	起始样品量超出了裂解液 MRL 的处理范围	选择合适的起始处理量。
	样品中含有有机溶剂（如乙醇，DMSO 等），强缓冲液或碱性溶液。	避免这些可以改变裂解液 MRL 性质或者 PH 值的物质。

目 录

接前表

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
	吸取上清时吸入了中间相	做步骤9吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相。
RNA降解, 完整性不佳	RNA 提取所用各种物品和试剂没有灭活 RNA 酶	按照注意事项准备 RNA 提取的各种用品。
	组织取出后没有马上处理或冷冻, 提取前已经降解	组织应该尽量立刻处理, 不能及时处理的应该尽快保存于液氮或者-70℃。
	提取的 RNA 样品没有保存在-20℃或-70℃低温	尽可能的将 RNA 保存在-70℃的低温。
	样品提取过程中降解	提取动作应该尽可能的快, 离心应该低温进行, 取用 RNA 时尽量冰上进行。
下游的 RT-PCR实验不成功	忘记做步骤 10, 或者将吸附柱取出时下端碰到了收集管里面的漂洗液, 造成洗脱下来的 RNA 含有乙醇, 乙醇抑制了逆转录反应	确保做了步骤 14, 然后小心取出吸附柱, 可以在空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。

一、试剂盒组成、储存、稳定性.....	1
二、原理简介.....	2
三、试剂盒特点.....	2
四、注意事项.....	2
五、操作步骤.....	4
六、疑难解答.....	6

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。
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 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)。
11. 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。

12. 加入 700 μ l 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。
13. 加入 500 μ l 漂洗液 RW, 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。
14. 将吸附柱 RB 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。
15. 取出吸附柱 RB, 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 microRNA 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。