



2011-11-18

**miRNeasy Mini Kit (CAT#217004) –
动物细胞中纯化总RNA（包括小RNA） Protocol**

Amy

动物细胞中纯化总RNA（包括小RNA） Protocol:

注意事项:

- ❖ 不要让RNeasy Mini spin column（柱子）超载，这样会显著降低RNA的量和纯度；
- ❖ 收集的细胞如果当时不用，应当计数，置于-70度，应该缓慢解冻，这样轻弹管子，就可以使细胞脱落。均匀的细胞裂解液可以在-70度下储存数月，实验前应在37度水浴使其溶解，并且需要除盐。不要延长水浴的时间，避免RNA降解。
- ❖ 一般来说不需要使用DNA酶，因为配合QIAzol 和 RNeasy的技术已经可以去除大部分的DNA，但如果实验要求较高（比如实验中需要的RNA对少量的DNA很敏感），还是需要在RNA纯化完进行这一步操作的。

注意事项:

- ❖ Buffer RWT在储存的过程中可能会出现沉淀，如果有需要，可以适当加热或者置于室温 (15–25°C)使其溶解。
- ❖ QIAzol 裂解液和 Buffer RWT含有胍盐，因此不能和其它含有漂白剂成分的消毒液混合。
- ❖ 除了分相这一步，所有的步骤（包括离心）都应在室温下快速进行。

实验开始之前:

- ❖ Buffers RWT 和 RPE是以浓缩液的形式提供的，第一次使用之前按说明加入96%~100%浓度的乙醇，稀释成工作液。
- ❖ 进行DNA酶消化前应该按附录B的说明准备DNA酶消化液。

实验步骤:

❖ 按1a/1b的步骤收集细胞

- 悬浮细胞（小于 1×10^7 个）：以 $300 \times g$ 的速度离心 5 min，小心去除上清液（如果培养基去除得不净，会抑制和稀释裂解液，影响RNA与膜的结合，降低RNA的产量）
- 培养皿中单层贴壁细胞（小于 1×10^7 个）：可以直接在细胞培养皿中裂解，也可以用胰蛋白酶消化后，再收集裂解。（细胞需计数，完全除净细胞培养基）

对需要胰蛋白酶消化的细胞：吸净培养基，用PBS洗细胞；吸净PBS，加入含有0.1–0.25%胰蛋白酶的PBS消化；当细胞从培养皿中脱落以后，加入含血清的培养基终止胰蛋白酶的消化作用；将细胞悬液转移至去除RNA酶的离心管中， $300 \times g$ 离心 5 min，小心去除上清液。

- ❖ 加700μl的QIAzol裂解液重悬细胞，确保完全吹散细胞，避免RNA产量的下降。

对于单层贴壁细胞，直接在培养皿中加入700μl的QIAzol裂解液，用细胞刮刀收集细胞至一个新的离心管，保证能看见细胞团块。

- ❖ 如果处理 $\leq 3 \times 10^6$ 个细胞，涡旋1min混匀细胞，如果处理 $> 3 \times 10^6$ 细胞，可以使用QIAshredder homogenizer、TissueRuptor、或者针筒将细胞混匀。

如果重悬细胞不完全，会降低RNA的产量以及堵住柱子。均匀的细胞裂解液可以在-70度下储存数月

- ❖ 将细胞混悬液置于室温（15–25°C）5min。（这一步可以使核蛋白复合物解离）
- ❖ 想细胞混悬液中加入140μl的氯仿，盖上盖子，强力震荡15s（关键步骤）。
- ❖ 室温静置2~3min.
- ❖ 4°C， 12,000 x g 离心15 min，如果后续还有离心步骤，将离心机升温至室温。

离心后，样品分为3相：上层无色水相，包含RNA、中层白色相、下层红色有机相。上层水相体积应该将近350μl。（如果想要单独纯化富含miRNA的片段，这一步完成之后按附录A的步骤）

- ❖ 将上层水相转移至新的收集管中，加**1.5倍**体积（约**525 µl**）**100%**的乙醇，充分混匀，不要离心，直接进入下一步。（加入乙醇以后可能会形成沉淀，但并不影响整个过程）
- ❖ 吸取**700 µl**样品（包括可能形成的沉淀）到处于**2ml**收集管中的**RNeasy Mini spin** 柱中，盖上盖子，室温(**15–25°C**)，以**≥8000 x g** (大于**10,000 rpm**) 离心**15 s**。（下一步可重复使用收集管）
- ❖ 用剩下的样品重复第**9**步，弃流出液。（下一步可重复使用收集管）

注：如果需要使用**DNA**酶消化，这一步之后使用步骤**B1-B4**

可选:

加700 μ l Buffer RWT 到 RNeasy Mini spin column中，盖上盖子，以8000 x g (大于10,000 rpm) 离心15 s，洗柱，弃流出液。

如果使用DNA酶消化，可跳过此步。（下一步可重复使用收集管）

❖ 加500 μ l Buffer RPE 到RNeasy Mini spin column中，盖上盖子，以8000 x g (大于10,000 rpm) 离心15 s，洗柱，弃流出液。（下一步可重复使用收集管）

❖ 再加500 μ l Buffer RPE 到RNeasy Mini spin column中，盖上盖子，以8000 x g (大于10,000 rpm) 离心2min，干燥RNeasy Mini spin column的膜。

长时间离心可以干燥spin column的膜，保证RNA洗脱液中没有乙醇残留，因为残留的乙醇可能会影响下游的反应。

离心之后，从收集管中小心取出RNeasy Mini spin column，避免接触到流出液，否则会有乙醇残留。

可选:

将RNeasy Mini spin column置于一个新的2ml收集管中，弃含有流出液的旧的收集管，全速离心1min。

进行此步是为了去除任何可能残留的Buffer RPE或者上一步残留的流出液。

❖ 将RNeasy Mini spin column置于一个新的1.5ml的收集管中，直接加入30~50ul的RNase-free水到RNeasy Mini spin column膜中。盖上盖子，以8000 x g (大于10,000 rpm) 离心1min。

❖ 如果期望的RNA产量大于30ug，再加入30~50ul的RNase-free水重复步骤15，洗脱到相同的收集管中。

为了提高RNA浓度，第二次的洗脱步骤可以使用第1次的洗脱液（15步）。产量会低15%~30%，但浓度会更高。

附录D:

人白细胞中纯化总RNA（包括小RNA）

这个Protocol是针对使用miRNeasy Mini Kit进行包括18个核苷酸以上小RNA的总RNA的纯化，使用此kit，需要单独购买Buffer EL (cat. no. 79217)。

步骤:

❖ 将1体积的人全血和5体积的Buffer EL混匀。

为了得到最佳的结果，混合液体积不能超过管子的3/4

使用合适体积的全血，可以使用1.5ml的健康血液（每ml约含4000~7000个白细胞），如果血液中白细胞含量较高，可以适当降低血液的体积。

❖ 冰上孵育10~15min，孵育过程中短涡旋2次。

孵育过程中，浑浊液会逐渐变清，表示红细胞的裂解。如果有必要，孵育时间可以延长至20min。

❖ 4°C，以400 x g离心 10 min，完全去除和丢弃上清。离心后白细胞会形成沉淀。保证完全去除上清液，下面的洗涤步骤可以除去少量的红细胞（使细胞沉淀显红色）。

❖ 细胞沉淀中加入Buffer EL（体积约为全血体积的2倍），涡旋重悬细胞。

例如：如果第一步使用的全血为1ml，则加入2ml的Buffer EL。

- ❖ 4°C, 以 400 x g离心10 min, 完全去除和丢弃上清
上清液如果去除得不完全, 可能会干扰裂解, 以及随后的RNA与柱子的结合, 导致RNA产量的下降。
- ❖ 接着RNA纯化的第2步。Page5