
4. 第一次使用 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。

操作步骤

Protocol A: 总 RNA 的提取

提取的总 RNA 包括 miRNA 等其他<200 nt 的小分子 RNA，对 miRNA 的纯度要求不高时，比如在研究 miRNA RT-PCR、miRNA Northern blot 时也可以采用此方法。

1. 样品处理：

1a) **组织**：将组织在液氮中充分研磨，每 30-50 mg 动物组织或者 100 mg 植物组织中加入 1 ml Buffer RZ，震荡混匀。样品体积不超过 Buffer RZ 体积的十分之一。

1b) **单层培养细胞**：吸去培养液，向直径 3.5 cm 的培养板/瓶中加入 1 ml Buffer RZ（按培养板面积而不是细胞数决定加入量，每 10 cm² 加入 1 ml），用移液器轻轻反复吸打裂解细胞至溶液透明。

1c) **细胞悬液**：离心得到细胞沉淀，弃上清，每 5×10^6 - 1×10^7 细胞加入 1 ml Buffer RZ 混匀裂解细胞。加入 Buffer RZ 前不要洗涤细胞，以免降解 mRNA。

2. 样品中加入 Buffer RZ 后反复吹打几次，使其充分裂解。室温（15-30℃）放置 5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

3. 加入 200 μ l 氯仿，盖好管盖，剧烈振荡 15 s，室温放置 3 min。

4. 4℃，12,000 rpm 离心 10 min，样品会分成三层：下层有机相，白色的中间层和无色的上层水相，RNA 存在于水相中。将上层水相移到一个新的离心管中（量取溶液体积）。

5. 向步骤 4 得到的溶液中加入 1.5 倍上清体积的无水乙醇，颠倒混匀（可能会出现沉淀，不影响后续操作），将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RA）中，若一次不能将全部溶液加入吸附柱，请分两次转入，室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液，将吸附柱 RA 重新放回收集管中。

6. 向吸附柱 miRA 中加入 500 μ l Buffer miRW1，室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

7. 向吸附柱 miRA 中加入 600 μ l Buffer RW2（使用前检查是否加入无水乙醇！），室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

8. 重复步骤 7。

9. 将吸附柱 miRA 放回空收集管内，室温 12,000 rpm 离心 2 min。

注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

10. 将吸附柱 miRA 放入新的 RNase-free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 **30-50 μ l RNase-Free H₂O**，室温放置 2 min，室温 12,000 rpm 离心 1 min，得到 miRNA 溶液，-70°C 保存。

注意：RNase-Free H₂O 体积不应少于 30 μ l，体积过小影响回收效率。如需提高终浓度，可将洗脱的 miRNA 溶液再次加入到吸附柱中二次洗脱。

Protocol B: miRNA 富集提取

富集的 miRNA 去除了较大片段的 mRNA 和 rRNA 等，对 miRNA 的纯度要求较高时，比如在研究 miRNA 芯片、miRNA 克隆时建议采用此方法。

1~4 步骤同 protocol A。

5. 向步骤 4 得到的溶液中加入 **0.43 倍体积的无水乙醇**，混匀（此时可能会出现絮状沉淀），将得到的溶液和可能产生的絮状沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 RA（Spin Columns RA）中。12,000 rpm 离心 30 s，离心后弃掉吸附柱 RA，**保留滤液（计算体积，miRNA 在滤液中）**。
6. 向滤液中加入 **0.75 倍滤液体积的无水乙醇**，混匀。将得到的溶液转入已装入收集管的吸附柱 miRA（Spin Columns miRA）中。若一次不能将全部溶液加入吸附柱，请分两次转入。室温 12,000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 miRA 重新放回收集管中。
7. 向吸附柱 RA 中加入 500 μ l Buffer miRW1，室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
8. 向吸附柱 RA 中加入 600 μ l Buffer RW2（使用前检查是否加入无水乙醇！），室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
9. 重复步骤 8。
10. 将吸附柱放回空收集管内，室温 12,000 rpm 离心 2 min。
注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。
11. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 **30-50 μ l RNase-Free H₂O**，室温放置 2 min，室温 12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液，-70°C 保存。
注意：RNase-Free H₂O 体积不应少于 30 μ l，体积过小影响回收效率。如需提高终浓度，可将洗脱的 RNA 溶液再次加入到吸附柱中二次洗脱。

