

如何提取小小的 miRNA?



近年来，microRNA (miRNA) 成了生命科学和医学研究中的明星。这种 22 个核苷酸的小分子在基因表达调控中起着至关重要的作用，它似乎掌控着多把开启科学之门的钥匙，例如发育、分化和凋亡。而它又与多种癌症和疾病息息相关。正因为它是如此重要，大家都迫不及待地想把它看清楚。miRNA 相关的技术和工具也越来越多，生物通就先来谈谈其中最基本的工具——miRNA 的提取。

无论是芯片分析，还是 miRNA 的克隆，miRNA 的提取都是最基础的步骤。以往传统的 RNA 提取试剂盒都是为了回收 mRNA 而设计的，往往会弃去较小的 RNA 分子以提高 mRNA 得率，而这些步骤会导致 miRNA 的损失。多数 RNA 纯化试剂盒采用标准的玻璃纤维滤膜或者硅胶滤膜，不能有效地回收小分子 RNA。不过，为了顺应市场的需求，各大公司纷纷推出 miRNA 提取产品。

不同的样本有不同的试剂盒相对应。细胞、组织这种最常见的样本当然有多种试剂盒可用，不过血液、FFPE 样本也不用担心。生物通来为你一一介绍。

Ambion 的 mirVana miRNA Isolation Kit 是最早上市的 miRNA 提取试剂盒，也是应用最广的，查阅 miRNA 的相关文献，很多都用了 Ambion 的这个 kit。它采用改良的玻璃纤维滤膜方法来快速回收细胞或者组织样本中全部 RNA，包括 miRNA。样品量为 10^2 - 10^7 个细胞，或者 0.5-250mg 组织。首先用变性裂解液裂解样品，让 RNase 失活，使 RNA 稳定。裂解液随后用酸-酚：氯仿来萃取，去除大部分细胞成分，留下半纯的 RNA 样品。然后再通过玻璃纤维滤膜来进行纯化，不过在最后一步之前，你要做一个选择，是纯化总 RNA 呢，

还是只纯化小分子 RNA。如果你想要用芯片做 miRNA 表达图谱研究，我们还是建议你先纯化总 RNA，再用胶纯化富集 miRNA，这样做似乎麻烦了一些，但它能准确地定量 RNA，并评估它的质量，来确认是否能用于芯片分析。纯化总 RNA 的步骤就与一般的 RNA 纯化类似。而纯化小分子 RNA 则多了一步：先用 25% 的乙醇将大的 RNA 固定住，小分子 RNA 以滤出液形式收集，然后将乙醇浓度提高到 55%，把小分子 RNA 固定住，最后是洗涤和洗脱，就可以富集 200nt 以内的 RNA 片段。它的价格是 3630 元，能纯化约 40 次，单次价格在 90 元。

核酸提取一贯是 QIAGEN 公司的绝活，对于 miRNA 这样的小分子，QIAGEN 自有妙招。它推出了 miRNeasy Mini Kit，能从多种动物组织和细胞中纯化 miRNA 和总 RNA。这个 kit 也是结合了基于酚/胍的样品裂解和经典的硅胶膜离心柱，配上优化好的各种 buffer，只要 RNA 大于 18nt，就能照单全收。最大样品体积为 10^7 个细胞，或 50mg 组织（脂肪组织可以达到 100mg）。这个 kit 的价格就相对更平易近人了，50 次的目录价为 3130 元，每一次只需要 62.6 元，要是碰上打折促销，那就更美了。不过如果你只想要 miRNA，还需要另一个 RNeasy MinElute Cleanup Kit 来

协助。miRNeasy Mini Kit 适于样品不太多的情况下分析，如果你做高通量分析，则 miRNeasy 96 Kit 更合适。

分子生物学的老大哥Invitrogen公司自然也不甘落后，在miRNA方面推出了一系列产品。除了大家熟悉的Ncode miRNA芯片外，还有PureLink miRNA Isolation Kit。这个试剂盒的原理与Ambion的有些类似，都是样品裂解后，在低乙醇浓度下将小分子RNA洗脱，然后将乙醇浓度提高，小分子RNA固定在硅胶膜上。不过它的样品量比较小，细胞不得超过 10^6 个，组织最多 5mg，这样看来价格就有些小贵了，2592 元/ 25 次。如果你想要的是包含miRNA的总RNA，来方便评估RNA的质量，还是用最经典的TRIZOL吧。它可以抽提所有RNA，价格也相当实惠，1050 元/ 100ml，真可谓物美价又廉，难怪很多文献中还是提到了它。

以化学品起家的Sigma-Aldrich这几年也开始在分子生物学上发力了，去年底推出了mirPremier microRNA Isolation Kit，它是采用一种新颖的方法来提取小分子RNA的，不需要用酚和氯仿，更加安全，而且速度很快，只需要 30 分钟，就能得到多达 20ng 的小分子RNA，用于 RT-PCR 或 Northern blot。哺乳动物细胞、动物组织、植物组织和微生物培养物都可以用这个 kit 来提取 miRNA，价格也相对便宜，50 次的只需要 3024.45 元。当然，它也可以用来提取总 RNA。

上面说的这些试剂盒都是适用于普通的细胞或组织，如果你的样品是甲醛固定石蜡包埋（FFPE）的组织呢，也不用发愁，还是可以有很多的选择的。

Roche 的 High Pure miRNA Isolation Kit

就是一个多面手，它不仅能从细胞、动植物组织中提取 miRNA，还能从 FFPE 样品中提取。它适用的 FFPE 样品大小为 5-10um

（1cm×1cm），先用二甲苯脱蜡，乙醇洗涤之后再用裂解液、SDS 和蛋白酶 K 处理，后面的流程就与普通的组织一样了。除去脱蜡和蛋白酶 K 这些比较繁琐耗时的步骤之外，其他步骤只需要 30 分钟，不过提取效率可是与蛋白酶 K 的消化步骤密不可分哦，千万不要急于求成，草草消化了是。此 kit 的价格为 3982 元（50 次），单次售价 79.64 元。考虑到它的应用范围更广，内含的试剂也多了两种，应该还算合理吧。

QIAGEN 的 miRNeasy 提取试剂盒也有 FFPE 的版本。miRNeasy FFPE Kit 用了一个全新的方法来去除 RNA 与甲醛的交联，使下游应用中 RNA 的表现更好。另外，它还引进了独特的 gDNA 去除柱，无需 DNase 消化即可去除基因组 DNA 的污染。价格嘛，当然比 miRNeasy Mini Kit 贵一些，3650 元/ 50 次。Ambion 也新推出了专利的 RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit，专门是为提取 FFPE 样品中的 DNA 和 RNA 而设计的，提取的核酸中包括了样品中全部的 miRNA，配合 flashPAGE Fractionator 系统和 mirVana miRNA Array 可用于 miRNA 表达图谱分析。RecoverAll 这个试剂盒本来的价格挺贵，40 次价格为 3927 元，但现在正好赶上 ABI 和吉泰联手搞促销，买一送一，那就非常划算了。

假如你的样品是血液，上面这些试剂盒似乎都不太合适，没关系，下面将有三个候选 kit 闪亮登场。第一位大家都不陌生了，就是 TRIZOL LS（Invitrogen）。它可谓是 TRIZOL 的同胞兄弟了，其实大家本质都是一样的，唯一不同的只是其中成分的浓度，TRIZOL LS 更

浓一些，所以更适用于液体样品。TRIzol LS 可以取代 TRIzol 用于固体样品，不过一定要稀释。反之，TRIzol 则不能替代 TRIzol LS，那只会导致产率下降。

第二位则是 Ambion 公司选送的 LeukoLOCK Total RNA Isolation System。它是专为人血优化设计的，采用了创新的过滤柱来分离白细胞，可免去离心之苦，一次可处理 9-10ml 血液。然后再加入其中的 RNAlater，能保护分离的白细胞 RNA 不被降解，室温时可以放置三天，低温下则可以保存几个月。之后你可以通过内含的磁珠来提取 RNA，不过如果你要做 miRNA 分析，Ambion 还提供了一个替代方法，将 LeukoLOCK 分离柱与 TRI Reagent 结合使用，就能得到包含小分子 RNA 的总 RNA，而且 RNA 的质量和纯度保持不变，产量则显著提高了~50%-100%。

最后一个还是 Ambion 公司的，谁叫人家是 RNA Company 呢，RNA 方面本来就是它的强项。RiboPure-Blood Kit 适于加了抗凝血剂的全血，不超过 0.5ml。对于 miRNA 分析的使用者来说，提取步骤和标准的 protocol 有一点区别，Ambion 稍稍做了改动，以便更好地提取小分子 RNA。不过这个 kit 也是针对人血的，如果你的样品是小鼠或大鼠，你可以选 Mouse RiboPure-Blood RNA Isolation Kit。它们都含有 RNAlater 稳定剂。

有时只是分析 miRNA 的表达谱还不够，你还想了解 miRNA、mRNA 和蛋白水平的关联性，可是，样品本来就并不多，怎么办呢？现在不用一分为二了，有一个 2 合 1 的试剂盒，mirVana PARIS Kit，不要误解了，这个

PARIS 跟巴黎可没什么关系，它代表 Protein And RNA Isolation System。它能同时提取样品中的天然蛋白和所有的 RNA，包括小分子 RNA，如 miRNA、snRNA 和 snoRNA。这个 kit 用了一种特殊的细胞裂解 buffer，裂解之后蛋白保持完整，能直接用于双向电泳、Western Blot 或酶分析。而剩余的裂解液就继续用于提取 RNA，得到的 RNA 可用于 RT-PCR、杂交或芯片分析。一次实验就得到了所有想要的组分，真是两全其美。

提取完 RNA 之后，当然还要看看 RNA 的量有多少，纯度如何。测 OD260、280 是最常用的方法，不过准确性不太高。文献中最常用的还是 Agilent 2100 Bioanalyzer。微量、快速和自动化是 2100 生物分析仪最主要的特点。核酸样品只需要 1ul，蛋白质和细胞样品也只需要 4ul 和 10ul，节省了宝贵的样品；5 分钟内可完成样品上样，30 分钟完成整个芯片的样品分离和数据分析，快速简便；自动化分析，只需手工上样，无需更多操作。不过最吸引用户的还是 RIN —RNA Integrity number，这是安捷伦特有的专利保护 RNA 完整性指数，全面考虑各种 RNA 的因素，经专利函数计算而得。全球 82% 的芯片领域用户将其作为 RNA 质控标准，可以说是全球公认的 RNA 质控金标准，难怪这么多人信任它。

miRNA 提取试剂盒这个看似简单的东西，其中也有不少讲究。希望这篇文章能帮你选择到最适合的产品。更多 miRNA 相关的文章，敬请期待！

（生物通 余亮）