

总 RNA 小量提取试剂盒

本试剂盒适用于从各种真菌、细菌、动植物组织、细胞中提取总 RNA。本试剂盒无需酚、氯仿等有毒试剂，具有安全、高效、稳定的特点。试剂盒内所有试剂与耗材均无 RNase 活性，提取得到的 RNA 分子完整、纯度高，适用于各种后续分子生物学实验，如：RT-PCR、体外翻译、Northern Blotting、构建文库等。

一、试剂盒组成与保存

Cat.	EK02504	EK02505	EK02525
制备次数	4 tests	50 tests	250 tests
RNA column	4	50	250
2.0ml collection tube	4	50	250
1.5ml collection tube	8	100	500
RNA buffer I	3 ml	25 ml	125 ml
RNA buffer II	1 ml	10 ml	50 ml
Wash buffer A2	2.4 ml	24 ml	120 ml
Wash buffer B	2.4 ml	24 ml	72 ml×2
Buffer TE (RNase-free)	1 ml	6 ml	30 ml

本试剂盒可以在室温条件运输和保存。

二、注意事项和实验前的准备

- 1、部分试剂中含有刺激性物质，操作时需要佩戴手套，并避免直接接触皮肤，若有不慎沾染到皮肤或是眼睛时，需要立即使用大量清水冲洗，必要时就医。
- 2、第一次使用前，先在 Wash buffer A2 与 Wash buffer B 中按照试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 3、本试剂盒所有试剂与耗材都是经过处理，无 RNase 污染，因此请使用无 RNase 污染的枪头取用试剂，以防 RNase 污染。
- 4、实验操作中离心步骤，建议在 4℃ 的条件下离心。

三、实验步骤

不同来源的抽提材料方案不同，请注意选择实验方案。

1、细胞来源：

1.1 新鲜分离的动物组织细胞悬液、培养瓶或培养皿中消化处理的细胞悬液、悬浮培养的细胞：

- 1.1.1 取用 $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 个细胞，2000g 离心 5min，弃上清，收集细胞；
- 1.1.2 加入 400 μ l RNA buffer I，用注射器反复抽吸 10 次，匀浆，转移至 1.5ml 离心管中；
- 1.1.3 加入 150 μ l RNA buffer II，漩涡振荡 20sec，12000g 离心 5min；
- 1.1.4 取上清至新的 1.5ml 离心管中，加入 250 μ l 异丙醇，混合均匀；
- 1.1.5 将 RNA column 放入 2.0ml collection tube（试剂盒中提供）中，将 1.1.4 中的混合液转移至 RNA column 中，6000g 离心 1min，弃滤液；
- 1.1.6 再向 RNA column 中加入 500 μ l Wash buffer A2，12000g 离心 1min，弃滤液；

注：确认 Wash buffer A2 中已加入指定体积的无水乙醇。

1.1.7 再向 RNA column 中加入 700 μ l Wash buffer B, 12000g 离心 1min, 弃滤液;

注：确认 Wash buffer B 中已加入指定体积的无水乙醇。

1.1.8 重复步骤 1.1.7 一次;

1.1.9 将 RNA column 放回 2.0ml collection tube, 12000g 离心 2min;

1.1.10 将制备管放入一个新的 1.5ml collection tube (试剂盒内提供), 在 column 膜中央滴加 50-100 μ l Buffer TE, 室温静置 1min;

1.1.11 12000g 离心 1min, 收滤液得到 RNA。

1.2 6-、12-、24-、96-孔细胞培养板贴壁培养的细胞:

1.2.1 尽可能的洗净培养板中的培养基, 每孔中加入 300 μ l RNA buffer I, 反复吹打悬浮细胞;

1.2.2 将该悬液转移至 1.5ml 离心管中, 使用注射器反复抽吸 10 次, 匀浆;

1.2.3 加入 110 μ l RNA buffer II, 漩涡振荡 20sec, 12000g 离心 5min;

1.2.4 取上清至新的 1.5ml 离心管中, 加入 250 μ l 异丙醇, 混合均匀;

1.2.5 将 RNA column 放入 2.0ml collection tube (试剂盒内提供) 中, 将 1.2.4 中的混合液转移至 RNA column 中, 6000g 离心 1min, 弃滤液;

1.2.6 再向 RNA column 中加入 500 μ l Wash buffer A2, 12000g 离心 1min, 弃滤液;

注：确认 Wash buffer A2 中已加入指定体积的无水乙醇。

1.2.7 再向 RNA column 中加入 700 μ l Wash buffer B, 12000g 离心 1min, 弃滤液;

注：确认 Wash buffer B 中已加入指定体积的无水乙醇。

1.2.8 重复步骤 1.2.7 一次;

1.2.9 将 RNA column 放回 2.0ml 离心管, 12000g 离心 2min;

1.2.10 将 RNA column 放入一个新的 1.5ml collection tube (试剂盒内提供), 在 column 膜中央滴加 50-100 μ l Buffer TE, 室温静置 1min;

1.2.11 12000g 离心 1min, 收滤液得到 RNA。

2、组织来源:

组织	用量
肝脏等富含 RNA 的动物组织	≤ 30 mg
肌肉等 RNA 含量较低低的动物组织	≤ 100 mg
植物叶子	10-80mg
植物纤维组织	100-150mg
≤ 20 mg 组织	RNA buffer I、II 与异丙醇用量减半
≥ 40 mg 组织	RNA buffer I、II 与异丙醇用量按比例增加

2.1 取 20-40mg 动物组织或 30-150mg 植物组织, 至预冷的研钵中, 加入液氮, 将组织研碎成粉末;

2.2 向粉末中加入 400 μ l RNA buffer I, 使用注射器反复抽吸 10 次, 将该悬液转入 1.5ml 离心管;

2.3 加入 150 μ l RNA buffer II, 漩涡振荡 20sec, 12000g 离心 5min;

2.4 取上清至新的 1.5ml 离心管中, 加入 250 μ l 异丙醇, 混合均匀;

2.5 将 RNA column 放入 2.0ml collection tube (试剂盒内提供) 中, 将 2.4 中的混合液转移至 RNA column 中, 6000g 离心 1min, 弃滤液;

- 2.6 再向 RNA column 中加入 500 μ l Wash buffer A2,12000g 离心 1min, 弃滤液;
注: 确认 Wash buffer A2 中已经加入指定体积的无水乙醇。
- 2.7 再向 RNA column 中加入 700 μ l Wash buffer B, 12000g 离心 1min, 弃滤液;
注: 确认 Wash buffer B 中已经加入指定体积的无水乙醇。
- 2.8 重复步骤 2.7 一次;
- 2.9 将 RNA column 放回 2.0ml collection tube, 12000g 离心 2min;
- 2.10 将 RNA column 放入一个新的 1.5ml collection tube (试剂盒内提供), 在 column 膜中央滴加 50-100 μ l Buffer TE, 室温静置 1min;
- 2.11 12000g 离心 1min, 收滤液得到 RNA

3、细菌来源:

- 3.1 取 0.5-2 $\times 10^9$ 的细菌菌液 (以大肠杆菌为例, OD₆₀₀ 为 1 的菌液, 细胞数约为 1 $\times 10^9$ /ml。如果所取菌量大于 2 $\times 10^9$ 或小于 0.5 $\times 10^9$, 按比例增加或减半 RNA buffer I、II 与异丙醇的用量);
- 3.2 12000g 离心 1min, 弃上清。使用 50 μ l PBS 充分吹打或漩涡振荡悬浮菌体, 将悬液转移至预冷的研钵中, 加入液氮研磨成粉末;
- 3.3 向粉末中加入 400 μ l RNA buffer I, 使用注射器反复抽吸 10 次, 将该悬液转入 1.5ml 离心管;
- 3.4 加入 150 μ l RNA buffer II, 漩涡振荡 20sec, 12000g 离心 5min;
- 3.5 取上清至新的 1.5ml 离心管中, 加入 250 μ l 异丙醇, 混合均匀;
- 3.6 将 RNA column 放入 2.0ml collection tube (试剂盒内提供) 中, 将 2.4 中的混合液转移至 RNA column 中, 6000g 离心 1min, 弃滤液;
- 3.7 再向 RNA column 中加入 500 μ l Wash buffer A2,12000g 离心 1min, 弃滤液;
注: 确认 Wash buffer A2 中已经加入指定体积的无水乙醇。
- 3.8 再向 RNA column 中加入 700 μ l Wash buffer B, 12000g 离心 1min, 弃滤液;
注: 确认 Wash buffer B 中已经加入指定体积的无水乙醇。
- 3.9 重复步骤 3.8 一次;
- 3.10 将 RNA column 放回 2.0ml collection tube, 12000g 离心 2min;
- 3.11 将 RNA column 放入一个新的 1.5ml collection tube (试剂盒内提供), 在 column 膜中央滴加 50-100 μ l Buffer TE, 室温静置 1min;
- 3.12 12000g 离心 1min, 收滤液得到 RNA。

4、酵母来源:

- 4.1 取 0.5-2 $\times 10^7$ 的酵母菌液 (对于酵母培养物, OD₆₀₀ 为 1 的菌液, 细胞数约为 3 $\times 10^7$ /ml。如果取的酵母数大于 2 $\times 10^7$ 或小于 0.5 $\times 10^7$, 按比例增加或减半 RNA buffer I、II 与异丙醇的用量);
- 4.2 酵母细胞的裂解。酵母细胞的裂解方法有 2 种:
 - 4.2.1 液氮研磨法
 - 4.2.1.1 将 4.1 中的菌液 12000g 离心 1min, 弃上清, 使用 50 μ l PBS 充分吹打或漩涡振荡悬浮菌体, 将悬液转移至预冷的研钵中, 加入液氮研磨成粉末;
 - 4.2.1.2 向粉末中加入 400 μ l RNA buffer I, 使用注射器反复抽吸 10 次, 将该悬液转入 1.5ml 离心管;
 - 4.2.1.3 加入 150 μ l RNA buffer II, 漩涡振荡 20sec, 12000g 离心 5min;

- 4.2.1.4 取上清至新的 1.5ml 离心管中，加入 250 μ l 异丙醇，混合均匀；
- 4.2.2 酶解法（Lyticase 裂解法）
- 4.2.2.1 配置 Lyticase 裂解液（Lyticase, 1M 山梨糖醇, 0.1M EDTA, pH7.5, 使用前加入 β -巯基乙醇至终浓度 0.1% (v/v)), Lyticase 每 50 单位可以裂解 1×10^7 的酵母细胞；
- 4.2.2.2 将 4.1 中的菌液 12000g 离心 1min, 弃上清, 使用 1ml Lyticase 裂解液充分悬浮细胞。30 $^{\circ}$ C 温育 30min, 并不时的轻微颠倒以形成原生质体。3000g 离心 5min, 弃上清；
- 4.2.2.3 向沉淀中加入 400 μ l RNA buffer I, 使用注射器反复抽吸 10 次, 将该悬液转入 1.5ml 离心管；
- 4.2.2.4 加入 150 μ l RNA buffer II, 漩涡振荡 20sec, 12000g 离心 5min；
- 4.2.2.5 取上清至新的 1.5ml 离心管中，加入 250 μ l 异丙醇，混合均匀；
- 4.3 将 RNA column 放入 2.0ml collection tube（试剂盒内提供）中，将 4.2 中的混合液转移至 RNA column 中，6000g 离心 1min, 弃滤液；
- 4.4 再向 RNA column 中加入 500 μ l Wash buffer A2, 12000g 离心 1min, 弃滤液；
注：确认 Wash buffer A2 中已经加入指定体积的无水乙醇。
- 4.5 再向 RNA column 中加入 700 μ l Wash buffer B, 12000g 离心 1min, 弃滤液；
注：确认 Wash buffer B 中已经加入指定体积的无水乙醇。
- 4.6 重复步骤 4.5 一次；
- 4.7 将 RNA column 放回 2.0ml collection tube, 12000g 离心 2min；
- 4.8 将 RNA column 放入一个新的 1.5ml collection tube（试剂盒内提供），在 column 膜中央滴加 50-100 μ l Buffer TE, 室温静置 1min；
- 4.9 12000g 离心 1min, 收滤液得到 RNA。
- 5、丝状真菌来源：**
- 5.1 取 30-100mg 菌丝体（当菌丝体用量小于 30mg 时，RNA buffer I、II 与异丙醇的用量均减半；当菌丝体用量大于 100mg 时，按比例增加 RNA buffer I、II 与异丙醇的用量），放入预冷的研钵，加入液氮研磨成粉末；
- 5.2 向粉末中加入 400 μ l RNA buffer I, 使用注射器反复抽吸 10 次, 将该悬液转入 1.5ml 离心管；
- 5.3 加入 150 μ l RNA buffer II, 漩涡振荡 20sec, 12000g 离心 5min；
- 5.4 取上清至新的 1.5ml 离心管中，加入 250 μ l 异丙醇，混合均匀；
- 5.5 将 RNA column 放入 2.0ml collection tube（试剂盒内提供）中，将 5.4 中的混合液转移至 RNA column 中，6000g 离心 1min, 弃滤液；
- 5.6 再向 RNA column 中加入 500 μ l Wash buffer A2, 12000g 离心 1min, 弃滤液；
注：确认 Wash buffer A2 中已经加入指定体积的无水乙醇。
- 5.7 再向 RNA column 中加入 700 μ l Wash buffer B, 12000g 离心 1min, 弃滤液；
注：确认 Wash buffer B 中已经加入指定体积的无水乙醇。
- 5.8 重复步骤 5.7 一次；
- 5.9 将 RNA column 放回 2.0ml collection tube, 12000g 离心 2min；
- 5.10 将 RNA column 放入一个新的 1.5ml collection tube（试剂盒内提供），在 column 膜中央滴加 50-100 μ l Buffer TE, 室温静置 1min；
- 5.11 12000g 离心 1min, 收滤液得到 RNA。