

UE 总 RNA 大量制备试剂盒

本试剂盒用于从各种动物组织、植物组织、细胞、细菌、酵母和丝状真菌中提取总 RNA。提取的总 RNA 分子完整、纯度高，适用于 Northern Blot、RT-PCR、体外翻译、Primer Extension、S1 核酸酶作图、RNase 保护测定、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

| Cat.No. | UE-MX-MS-RNA-10 | UE-MX-MS-RNA-25 |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| Kit size | 10 preps | 25 preps |
| Maxiprep RNA column | 10 | 25 |
| Lysate Filtration column | 10 | 25 |
| Buffer R-I | 180 ml | 450 ml |
| Buffer R-II | 70 ml | 160 ml |
| Buffer W1A concentrate | 120 ml | 288 ml |
| Buffer W2 concentrate | 120 ml | 2x150 ml |
| Buffer TE (DNase &RNase-free) | 30 ml | 80 ml |
| Protocol manual | 1 | 1 |

Maxiprep RNA column: 大量制备管。室温密封贮存。

Lysate Filtration column: 过滤柱，用于 DNA 和蛋白质的去除。室温密封贮存。

Buffer R-I: 细胞裂解液。室温密封贮存。

Buffer R-II: 中和液。室温密封贮存。

Buffer W1A concentrate: 洗涤液。使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇（可用 100%乙醇或 95%乙醇），混合均匀，室温密封贮存。

Buffer W2 concentrate: 去盐液。使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇（可用 100%乙醇或 95%乙醇），混合均匀，室温密封贮存。

Buffer TE (nuclease-free): 洗脱液。10 mM Tris-Cl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5。室温密封贮存。

二、注意事项

Buffer R-I 和 Buffer W1A 含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

三、实验准备

- 第一次使用时，在 Buffer W1A concentrate 和 Buffer W2 concentrate 中按试剂瓶上指定体积加入无水乙醇或 95%乙醇。
- 所有试剂用 DEPC 处理过的溶剂配制。请选用 RNase-free 枪头和离心管，以避免提取过程中 RNA 被 RNase 降解。

四、操作步骤

不同的样品提取总 RNA 的操作中略有区别，具体步骤分述如下：

【从动物组织中提取总 RNA】

- 取 0.25-1.5 g 组织，转移至预冷的研钵中，加液氮研磨成粉末。

*请按下面说明使用组织的量：

| | |
|-------------------|-------------------------|
| RNA 丰富的组织（如肝脏） | 不超过 0.8 g |
| RNA 含量低的组织（如肌肉） | 不超过 1.5 g |
| 当使用的组织量小于 0.4 g 时 | R-I, R-II 和异丙醇的使用量都减半 |
| 当使用的组织量大于 1.2 g 时 | R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加 |

*当组织的用量比较大时，可以先切碎再加少量 Buffer R-I，然后用匀浆器或组织捣碎器快速充分匀浆，并在步骤 2 加 Buffer R-I 时扣除匀浆时已加的 Buffer R-I 体积。

- 加 16 ml Buffer R-I，用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 50 ml 离心管中。
- 加 6 ml Buffer R-II，漩涡振荡 15-30 s，8,000×g 离心 10 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 转移上清到过滤柱中，插入注射器芯，垂直向下缓慢推注，使滤过液流入 50 ml 离心管中，滤过液加 10 ml 异丙醇，混和均匀。

步骤 5-10 可选择离心法或负压法

A. 离心法

- 将制备管置于 50 ml 离心管中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中，6,000×g 离心 5 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 15 ml Buffer W1A，8,000×g 离心 5 min。
*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 20 ml Buffer W2，8,000×g 离心 5 min；以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。
*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。
- 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。
- 室温静置 5 min，8,000×g 离心 5 min，洗脱得 RNA。

B. 负压法

- 将制备管插入负压装置的插口上，将步骤 4 中的混合液移入制备管中，开启并调节负压至 -20-30 英寸汞柱，吸尽管中溶液。
- 保持负压，加 15 ml Buffer W1A，吸尽管中溶液。
*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 保持负压，沿管壁四周加 20 ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。
*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 将制备管置于一个 50 ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。
- 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。
- 室温静置 5 min，8,000×g 离心 5 min，洗脱得 RNA。

【从植物组织中提取总 RNA】

- 取 0.4-1.5g 组织，转移至预冷的研钵中，加液氮研磨成粉末。

*请按下面说明使用组织的量：

| | |
|--------------------|-------------------------|
| 植物叶子 | 通常用量 0.4-1.5 g |
| 植物纤维组织 | 通常用量 0.5-2.0 g |
| 当植物叶组织量小于 0.4 g 时 | R-I, R-II 和异丙醇的使用量都减半 |
| 当植物叶组织量大于 1.2 g 时 | R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加 |
| 当植物纤维组织量大于 1.5 g 时 | R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加 |

*当组织的用量比较大时，可以先切碎再加少量 Buffer R-I，然后用匀浆器或组织捣碎器快速充分匀浆，并在步骤 2 加 Buffer R-I 时扣除匀浆时已加的 Buffer R-I 体积。

- 加 16 ml Buffer R-I，用装有 18-23 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 50 ml 离心管中。
- 加 6 ml Buffer R-II，漩涡振荡 15-30 s，8,000×g 离心 10 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 转移上清到过滤柱中，插入注射器芯，垂直向下缓慢推注，使滤过液流入 50 ml 离心管中，滤过液加 10 ml 异丙醇，混和均匀。

步骤 5-10 可选择离心法或负压法

A. 离心法

- 将制备管置于 50 ml 离心管中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中，6,000×g 离心 5 min。
*建议在 4°C 下离心。

6A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 15 ml Buffer W1A，8,000×g 离心 5 min。

*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

7A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 20 ml Buffer W2，8,000×g 离心 5 min；以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。

*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

8A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。

9A. 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。

10A. 室温静置 5 min，8,000×g 离心 5 min，洗脱得 RNA。

B. 负压法

5B. 将制备管插到负压装置的插口上，将步骤 4 中的混合液移入制备管中，开启并调节负压至 -20-30 英寸汞柱，吸尽管中溶液。

6B. 保持负压，加 15 ml Buffer W1A，吸尽管中溶液。

*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

7B. 保持负压，沿管壁四周加 20 ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。

*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

8B. 将制备管置于一个 50 ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。

9B. 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。

10B. 室温静置 5 min，8,000×g 离心 5 min，洗脱得 RNA。

【从细胞中提取总 RNA】

本方案适用于从 $0.5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ 的细胞中提取总 RNA。收集细胞，并进行细胞计数，如果细胞数小于 1×10^8 ，R-I，R-II 和异丙醇用量减半。如果细胞数大于 5×10^8 ，R-I，R-II 和异丙醇按比例增加。

1. 收集 $1 \times 10^8 - 5 \times 10^8$ 的细胞，2,000×g 离心 5 min，弃上清。

2. 加 16 ml Buffer R-I，用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 50 ml 离心管中。

3. 加 6 ml Buffer R-II，漩涡振荡 15-30 s，8,000×g 离心 10 min。

*建议在 4°C 下离心。

4. 转移上清到过滤柱中，插入注射器芯，垂直向下缓慢推注，使滤过液流入 50 ml 离心管中，滤过液加 10 ml 异丙醇，混和均匀。

步骤 5-10 可选择离心法或负压法

A. 离心法

5A. 将制备管置于 50 ml 离心管中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中，6,000×g 离心 5 min。

*建议在 4°C 下离心。

6A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 15 ml Buffer W1A，8,000×g 离心 5 min。

*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

7A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 20 ml Buffer W2，8,000×g 离心 5 min；以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。

*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

8A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。

9A. 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。

10A. 室温静置 5 min，8,000×g 离心 5 min，洗脱得 RNA。

B. 负压法

5B. 将制备管插到负压装置的插口上，将步骤 4 中的混合液移入制备管中，开启并调节负压至 -20-30 英寸汞柱，吸尽管中溶液。

6B. 保持负压，加 15 ml Buffer W1A，吸尽管中溶液。

*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

7B. 保持负压，沿管壁四周加 20 ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。

*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

8B. 将制备管置于一个 50 ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。

9B. 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。

10B. 室温静置 5 min，8,000×g 离心 5 min，洗脱得 RNA。

【从细菌中提取总 RNA】

1. 收集 $1 - 6 \times 10^{10}$ 的细菌，6,000×g 离心 10 min，弃上清。用 200 μ l PBS 充分悬浮菌体并转移至预冷的研钵中，加液氮研磨成粉末。

*请进行细菌计数，对于大肠杆菌而言， 1×10^9 /ml 细菌的 $OD_{600} \approx 1$ 。如果细菌量小于 1×10^{10} ，R-I，R-II 和异丙醇用量减半。如果细菌量大于 6×10^{10} ，R-I，R-II 和异丙醇按比例增加。

2. 加 16 ml Buffer R-I，用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 50 ml 离心管中。

3. 加 6 ml Buffer R-II，漩涡振荡 15-30 s，8,000×g 离心 10 min。

*建议在 4°C 下离心。

4. 转移上清到过滤柱中，插入注射器芯，垂直向下缓慢推注，使滤过液流入 50 ml 离心管中，滤过液加 10 ml 异丙醇，混和均匀。

步骤 5-10 可选择离心法或负压法

A. 离心法

5A. 将制备管置于 50 ml 离心管中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中，6,000×g 离心 5 min。

*建议在 4°C 下离心。

6A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 15 ml Buffer W1A，8,000×g 离心 5 min。

*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

7A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 20 ml Buffer W2，8,000×g 离心 5 min；以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。

*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

8A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。

9A. 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。

10A. 室温静置 5 min，8,000×g 离心 5 min，洗脱得 RNA。

B. 负压法

5B. 将制备管插到负压装置的插口上，将步骤 4 中的混合液移入制备管中，开启并调节负压至 -20-30 英寸汞柱，吸尽管中溶液。

6B. 保持负压，加 15 ml Buffer W1A，吸尽管中溶液。

*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

7B. 保持负压，沿管壁四周加 20 ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。

*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

8B. 将制备管置于一个 50 ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。

- 9B. 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。
10B. 室温静置 5 min, 8,000×g 离心 5 min, 洗脱得 RNA。

【从酵母中提取总 RNA】

本方案用于从 2×10^8 - 3×10^9 的酵母细胞中提取 RNA。请进行酵母细胞计数，也可用如下方法估算：对于一般酵母培养物而言， 3×10^7 /ml 酵母细胞的 $OD_{600} \approx 1$ 。如果酵母量小于 5×10^8 ，R-I, R-II 和异丙醇用量减半。如果酵母量大于 1×10^9 ，R-I, R-II 和异丙醇按比例增加。酵母的破碎和裂解方法有两种：机械法（如下 a）和酶法（如下 b）。机械法采用加液氮研磨的方法，酶法用 Lyticase 破壁形成原生质体。

步骤 1-4 根据酵母的破碎和裂解方式不同可以选择 a 或 b 两种实验方法

a. 机械法

- 1a. 收集 0.5 - 1×10^9 的酵母细胞， $6,000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清。用 200 μ l PBS 充分悬浮酵母细胞并转移至预冷的研钵中，加液氮研磨成粉末。
- 2a. 加 16 ml Buffer R-I, 用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 50 ml 离心管中。
- 3a. 加 6 ml Buffer R-II, 漩涡振荡 15-30 s, $8,000 \times g$ 离心 10 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 4a. 取上清至 50 ml 离心管中，加 10 ml 异丙醇，混和均匀。

b. 酶法

配置 Buffer YE:

- 1 M 山梨糖醇
- 0.1 M EDTA, pH 7.5
- 使用前加入 0.1% (V/V) 的 β -巯基乙醇

- 1b. 收集 0.5 - 1×10^9 的酵母细胞到 50 ml 离心管中， $6,000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清。用 10 ml 含有 Lyticase 的 Buffer YE 充分悬浮酵母细胞。30°C 保温 20-30 min, 并不时轻柔颠倒以形成原生质体。 $3,000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清。
*Lyticase 用量按每 1×10^7 酵母细胞加 50 单位计算。
- 2b. 加 16 ml Buffer R-I, 用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 50 ml 离心管中。
- 3b. 加 6 ml Buffer R-II, 漩涡振荡 15-30 s, $8,000 \times g$ 离心 10 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 4b. 取上清至 50 ml 离心管中，加 10 ml 异丙醇，混和均匀。

步骤 5-10 可选择离心法或负压法

A. 离心法

- 5A. 将制备管置于 50 ml 离心管中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中， $6,000 \times g$ 离心 5 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 6A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 15 ml Buffer W1A, $8,000 \times g$ 离心 5 min。
*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 7A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 20 ml Buffer W2, $8,000 \times g$ 离心 5 min; 以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。
*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 8A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中， $8,000 \times g$ 离心 5 min。

- 9A. 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。
- 10A. 室温静置 5 min, $8,000 \times g$ 离心 5 min, 洗脱得 RNA。

B. 负压法

- 5B. 将制备管插到负压装置的插口上，将步骤 4 中的混合液移入制备管中，开启并调节负压至 -20-30 英寸汞柱，吸尽管中溶液。
- 6B. 保持负压，加 15 ml Buffer W1A, 吸尽管中溶液。
*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 7B. 保持负压，沿管壁四周加 20 ml Buffer W2, 吸尽管中溶液; 以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。
*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 8B. 将制备管置于一个 50 ml 离心管中， $8,000 \times g$ 离心 5 min。
- 9B. 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。
- 10B. 室温静置 5 min, $8,000 \times g$ 离心 5 min, 洗脱得 RNA。

【从丝状真菌中提取总 RNA】

1. 取 0.4-1.5 g 菌丝体，转移至预冷的研钵中，加液氮研磨成粉末。

*请按下面说明使用组织的量:

| | |
|-------------------|-------------------------|
| 当使用的组织量小于 0.4 g 时 | R-I, R-II 和异丙醇的使用量都减半 |
| 当使用的组织量大于 1.5 g 时 | R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加 |

2. 加 16 ml Buffer R-I, 用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 50 ml 离心管中。
3. 加 6 ml Buffer R-II, 漩涡振荡 15-30 s, $8,000 \times g$ 离心 5 min。
*建议在 4°C 下离心。
4. 转移上清到过滤柱中，插入注射器芯，垂直向下缓慢推注，使滤过液流入 50 ml 离心管中，滤过液加 10 ml 异丙醇，混和均匀。

步骤 5-10 可选择离心法或负压法

A. 离心法

- 5A. 将制备管置于 50 ml 离心管中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中， $6,000 \times g$ 离心 5 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 6A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 15 ml Buffer W1A, $8,000 \times g$ 离心 5 min。
*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 7A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中，制备管中加 20 ml Buffer W2, $8,000 \times g$ 离心 5 min; 以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。
*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 8A. 弃滤液，将制备管置回到 50 ml 离心管中， $8,000 \times g$ 离心 5 min。
- 9A. 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。
- 10A. 室温静置 5 min, $8,000 \times g$ 离心 5 min, 洗脱得 RNA。

B. 负压法

- 5B. 将制备管插到负压装置的插口上，将步骤 4 中的混合液移入制备管中，开启并调节负压至 -20-30 英寸汞柱，吸尽管中溶液。
- 6B. 保持负压，加 15 ml Buffer W1A, 吸尽管中溶液。
*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 7B. 保持负压，沿管壁四周加 20 ml Buffer W2, 吸尽管中溶液; 以同样的方法再用 10 ml Buffer W2 洗涤一次。

*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

- 8B. 将制备管置于一个 50 ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。
- 9B. 将制备管放入一干净的 50 ml 离心管中，在制备管膜中央加 2 ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水。
- 10B. 室温静置 5 min，8,000×g 离心 5 min，洗脱得 RNA。

五、流程图

