

UE 总 RNA 小量制备试剂盒

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-MN-MS -RNA-10	UE-MN-MS -RNA-50	UE-MN-MS -RNA-250
Kit size	10 preps	50 preps	250 preps
Spin/vac mini column	10	50	250
2 ml microfuge tube	10	50	250
1.5 ml microfuge tube	20	100	500
Buffer R-I	5 ml	25 ml	125 ml
Buffer R-II	2 ml	10 ml	50 ml
Buffer W1A concentrate	5 ml	24 ml	120 ml
Buffer W2 concentrate	5 ml	24 ml	2x72 ml
Buffer TE (nuclease-free)	2 ml	6 ml	30 ml
Protocol manual	1	1	1

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 (DNase & RNase-free): 洗脱液。10 mM Tris-HCl, 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 20-40 mg 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 30 mg
RNA 含量低的组织（如肌肉）	不超过 100 mg
当使用的组织量小于 20 mg 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 40 mg 时	R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加

- 加 400 μ l Buffer R-I，用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中。
- 加 150 μ l Buffer R-II，漩涡振荡 15-30 s，12,000 \times g 离心 5 min。
*建议在 4 $^{\circ}$ C 下离心。
- 取上清至 1.5 ml 离心管中，加 250 μ l 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 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中，6,000 \times g 离心 1 min。

*建议在 4 $^{\circ}$ C 下离心。

- 6A. 弃滤液，将制备管置回到 2 ml 离心管中，制备管中加 500 μ l Buffer W1A，12,000 \times g 离心 1 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 2 ml 离心管中，制备管中加 700 μ l Buffer W2，12,000 \times g 离心 1 min；以同样的方法再用 700 μ l 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 2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1 min。

- 9A. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 70-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

- 10A. 室温静置 1 min，12,000 \times g 离心 1 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 500 μ l 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 700 μ l Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用 700 μ l 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 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，12,000 \times g 离心 1 min。

- 9B. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 70-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

- 10B. 室温静置 1 min，12,000 \times g 离心 1 min，洗脱得 RNA。

【从植物组织中提取总 RNA】

1. 取 30-150 mg 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 10-80 mg
植物纤维组织	通常用量 100-150 mg
当植物叶组织量小于 30 mg 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 80 mg 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 150 mg 时	R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加

2. 加 400 μ l Buffer R-I，用装有 18-23 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中。
3. 加 150 μ l Buffer R-II，漩涡振荡 15-30 s，12,000 \times g 离心 5 min。
*建议在 4 $^{\circ}$ C 下离心。
4. 取上清至 1.5 ml 离心管中，加 250 μ l 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 2 ml（试剂盒内提供）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 1 min。

*建议在 4 $^{\circ}$ C 下离心。

- 6A. 弃滤液，将制备管置回到 2 ml 离心管中，制备管中加 500 μ l Buffer W1A，12,000 \times g 离心 1 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 2 ml 离心管中，制备管中加 700 μ l Buffer W2, 12,000 \times g 离心 1 min; 以同样的方法再用 700 μ l 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 2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1 min。

9A. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 70-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

10A. 室温静置 1 min, 12,000 \times g 离心 1 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 500 μ l 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 700 μ l Buffer W2, 吸尽管中溶液; 以同样的方法再用 700 μ l 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 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，12,000 \times g 离心 1 min。

9B. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 70-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

10B. 室温静置 1 min, 12,000 \times g 离心 1 min, 洗脱得 RNA。

【从细胞中提取总 RNA】

步骤 1-4 根据细胞培养的方式不同可以选择 a 或 b 两种实验方法

a. 悬浮培养的动物细胞或从培养皿、培养瓶中获得的细胞悬浮液或新鲜分离的动物组织单细胞悬浮液:

1a. 收集 2×10^6 - 1×10^7 的细胞，2,000 \times g 离心 5 min, 弃上清。

2a. 加 400 μ l Buffer R-I, 用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中。

3a. 加 150 μ l Buffer R-II, 漩涡振荡 15-30 s, 12,000 \times g 离心 5 min。

*建议在 4 $^{\circ}$ C 下离心。

4a. 取上清至 1.5 ml 离心管中，加 250 μ l 异丙醇，混和均匀。

b. 96-孔, 24-孔, 12-孔, 或 6-孔培养板上贴壁培养的细胞:

1b. 从 96-孔, 24-孔, 12-孔或 6-孔培养板里收集细胞，尽量弃去培养基，每孔加 300 μ l Buffer R-I, 用移液枪上下吹打 8-10 次。

2b. 转移上述细胞悬浮液到 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次。

3b. 加 110 μ l Buffer R-II, 漩涡振荡 15-30 s, 12,000 \times g 离心 5 min。

*建议在 4 $^{\circ}$ C 下离心。

4b. 取上清至 1.5 ml 离心管中，加 200 μ l 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 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中，6,000 \times g 离心 1 min。

*建议在 4 $^{\circ}$ C 下离心。

6A. 弃滤液，将制备管置回到 2 ml 离心管中，制备管中加 500 μ l Buffer W1A, 12,000 \times g 离心 1 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 2 ml 离心管中，制备管中加 700 μ l Buffer W2, 12,000 \times g 离心 1 min; 以同样的方法再用 700 μ l 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 2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1 min。

9A. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 70-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

10A. 室温静置 1 min, 12,000 \times g 离心 1 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 500 μ l 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 700 μ l Buffer W2, 吸尽管中溶液; 以同样的方法再用 700 μ l 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 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，12,000 \times g 离心 1 min。

9B. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 70-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

10B. 室温静置 1 min, 12,000 \times g 离心 1 min, 洗脱得 RNA。

【从细菌中提取总 RNA】

1. 收集 0.5 - 2×10^9 的细菌，6,000 \times g 离心 10 min, 弃上清。用 50 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 OD₆₀₀≈1。如果细菌量小于 0.5×10^9 ，R-I, R-II 和异丙醇用量减半。如果细菌量大于 2×10^9 ，R-I, R-II 和异丙醇按比例增加。

2. 加 400 μ l Buffer R-I, 用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中。

3. 加 150 μ l Buffer R-II, 漩涡振荡 15-30 s, 12,000 \times g 离心 5 min。

*建议在 4 $^{\circ}$ C 下离心。

4. 取上清至 1.5 ml 离心管中，加 250 μ l 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 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中，6,000 \times g 离心 1 min。

*建议在 4 $^{\circ}$ C 下离心。

6A. 弃滤液，将制备管置回到 2 ml 离心管中，制备管中加 500 μ l Buffer W1A, 12,000 \times g 离心 1 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 2 ml 离心管中，制备管中加 700 μ l Buffer W2, 12,000 \times g 离心 1 min; 以同样的方法再用 700 μ l 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 2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1 min。

9A. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 70-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

10A. 室温静置 1 min, 12,000×g 离心 1 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 500 μl 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 700 μl Buffer W2, 吸尽管中溶液; 以同样的方法再用 700 μl 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 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 12,000×g 离心 1 min。

9B. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 在制备管膜中央加 70-100 μl Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

10B. 室温静置 1 min, 12,000×g 离心 1 min, 洗脱得 RNA。

【从酵母中提取总 RNA】

本方案用于从 2×10^6 - 5×10^7 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 OD₆₀₀ ≈ 1。如果酵母量小于 5×10^6 , R-I, R-II 和异丙醇用量减半。如果酵母量大于 2×10^7 , 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 $0.5-2 \times 10^7$ 的酵母细胞, 6,000×g 离心 10 min, 弃上清。用 50 μl 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 400 μl Buffer R-I, 用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次, 转入 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中。

3a. 加 150 μl Buffer R-II, 漩涡振荡 15-30 s, 12,000×g 离心 5 min。

*建议在 4°C 下离心。

4a. 取上清至 1.5 ml 离心管中, 加 250 μl 异丙醇, 混和均匀。

b. 酶法

配置 Buffer YE:

·1M 山梨糖醇

·0.1M EDTA, pH 7.5

·使用前加入 0.1% (VV) 的β-巯基乙醇

1b. 收集 $0.5-2 \times 10^7$ 的酵母细胞到 1.5 ml 离心管中, 6,000×g 离心 10 min, 弃上清。用 1 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 ×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 400 μl Buffer R-I, 用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次, 转入 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中。

3b. 加 150 μl Buffer R-II, 漩涡振荡 15-30 s, 12,000×g 离心 5 min。

*建议在 4°C 下离心。

4b. 取上清至 1.5 ml 离心管中, 加 250 μl 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 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 转移步骤 4 中的混合液到制备管中, 6,000×g 离心 1 min。

*建议在 4°C 下离心。

6A. 弃滤液, 将制备管置回到 2 ml 离心管中, 制备管中加 500 μl Buffer W1A, 12,000×g 离心 1 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 2 ml 离心管中, 制备管中加 700 μl Buffer W2, 12,000×g 离心 1 min; 以同样的方法再用 700 μl 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 2 ml 离心管中, 12,000×g 离心 1 min。

9A. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 在制备管膜中央加 70-100 μl Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

10A. 室温静置 1 min, 12,000×g 离心 1 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 500 μl 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 700 μl Buffer W2, 吸尽管中溶液; 以同样的方法再用 700 μl 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 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 12,000×g 离心 1 min。

9B. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 在制备管膜中央加 70-100 μl Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

10B. 室温静置 1 min, 12,000×g 离心 1 min, 洗脱得 RNA。

【从丝状真菌中提取总 RNA】

1. 取 30-100 mg 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 30 mg 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 100 mg 时	R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加

2. 加 400 μl Buffer R-I, 用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次, 转入 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中。

3. 加 150 μl Buffer R-II, 漩涡振荡 15-30 s, 12,000×g 离心 5 min。

*建议在 4°C 下离心。

4. 取上清至 1.5 ml 离心管中, 加 250 μl 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 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 转移步骤 4 中的混合液到制备管中, 6,000×g 离心 1 min。

*建议在 4°C 下离心。

6A. 弃滤液, 将制备管置回到 2 ml 离心管中, 制备管中加 500 μl Buffer W1A, 12,000×g 离心 1 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 2 ml 离心管中，制备管中加 700 μ l Buffer W2，12,000 \times g 离心 1 min；以同样的方法再用 700 μ l 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 2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1 min。

9A. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 70-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

10A. 室温静置 1 min，12,000 \times g 离心 1 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 500 μ l 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 700 μ l Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用 700 μ l 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 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，12,000 \times g 离心 1 min。

9B. 将制备管放入一干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 70-100 μ l Buffer TE (DNase & RNase-free) 或 RNase-free 水。

10B. 室温静置 1 min，12,000 \times g 离心 1 min，洗脱得 RNA。

五、流程图

