

UE 总 RNA 小量制备试剂盒（酶法）

本试剂盒可用于从各种动物组织、培养细胞、简单植物组织（非多糖多酚植物）和真菌中提取总 RNA。

试剂盒配套 DNase I，可直接在柱上消化残留基因组 DNA，高效去除基因组 DNA 残留，提取到的 RNA 纯度高，可直接用于 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。本试剂盒无需使用β-巯基乙醇和酚/氯仿等有毒有害试剂，无异味，更安全。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-MN-MS -RNA-V3-10	UE-MN-MS -RNA-V3-50	UE-MN-MS -RNA-V3-250
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-T	5 mL	25 mL	125 mL
Buffer R-II	2 mL	10 mL	50 mL
Buffer W1A concentrate	6 mL	28 mL	145 mL
Buffer W2 concentrate	5 mL	24 mL	2x72 mL
Buffer TE (nuclease-free)	2 mL	6 mL	30 mL
DNase I	120 μL	600 μL	5 X 600 μL
DNase I Buffer	1.8 mL	6 mL	30 mL
Protocol manual	1	1	1

Buffer R-T：细胞裂解液。室温密闭贮存。

Buffer R-II：中和液。室温密闭贮存。

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，室温密闭贮存。

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，室温密闭贮存。

Buffer TE（DNase & RNase-free）：洗脱液。10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5。室温密闭贮存。

DNase I：DNA 酶。置于-20℃保存。

DNase I Buffer：DNA 酶缓冲液。室温密闭贮存。

二、注意事项

1. Buffer R-T 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。
2. 本产品只适用于提取简单普通植物如白菜等，多糖多酚植物以及困难中草药植物、种子及果实的 RNA 提取请购买我司专用植物 RNA 提取试剂盒（货号：UE-MN-PP-RNA）。
3. 本产品仅提取>200 nt 的 RNA。当提取总量低于 3 μg 时，由于胍盐残留或滤膜吸附等，A260/A230 会低于 1。低浓度胍盐不影响反转录、qPCR 及二代测序等后续实验。若提取得率低，可适量提高样品用量和裂解液用量，核酸浓度高时，A260/230 可以明显改善。

三、实验准备

1. 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。
2. 所有试剂用 DEPC 处理过的溶剂配制。请选用 RNase-free 枪头和 RNase-free 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：

【从动物软组织中提取总 RNA】

1. 取 20-40 mg 组织，转移至预冷的研钵中，加液氮充分研磨成粉末。

*请按下面说明加入对应的量：

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-T、R-II 和异丙醇的使用量按步骤添加
当使用的组织量大于 40 mg 时	R-T、R-II 和异丙醇的使用量按比例增加

2. 加 400 μL Buffer R-T，用移液枪枪头反复吹打 8-10 次。
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℃下离心。
4. 弃沉淀，取上清液加入 250 μL 异丙醇，混和均匀。进行第 5 步。

*防止吸到沉淀

【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，加液氮充分研磨成粉末。

*请按下面说明加入对应的量：

植物叶子	通常用量 10-80 mg
植物纤维组织	通常用量 100-150 mg
当植物叶组织量大于 80 mg 时	R-T、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-T、R-II 和异丙醇的使用量按比例增加

2. 加 400 μL Buffer R-T，用移液枪枪头反复吹打 8-10 次。
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℃下离心。
4. 弃沉淀，取上清液加入 250 μL 异丙醇，混和均匀。进行第 5 步。

*防止吸到沉淀

【从细胞中提取总 RNA】

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

- 1a. 收集<5×10⁶的细胞，2,000×g 离心 5 min，弃上清。

*请按下面说明加入对应的量：

当收集 < 5×10 ⁶ 的细胞时	R-T、R-II 和异丙醇的使用量按步骤添加
当收集 ≥ 5×10 ⁶ 的细胞时	R-T、R-II 和异丙醇的使用量按比例增加

- 2a. 加 400 μL Buffer R-T，用移液枪枪头反复吹打 8-10 次。
- 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℃下离心。
- 4a. 弃沉淀，取上清液加入 250 μL 异丙醇，混和均匀。进行第 5 步。
- b. 96-孔，24-孔，12-孔，或 6-孔培养板上贴壁培养的细胞：
 - 1b. 培养板里尽量弃去培养基，直接在培养板中加入 Buffer R-T，每 10cm² 面积加 1mL Buffer R-T（至少加入 300 μL Buffer R-T），或使用胰酶处理后离心收集细胞沉淀，加入 Buffer R-T。移液枪反复吹打 8-10 次，看到明显的细胞裂解碎片；
 - 2b. 按 R-T：R-II=3：1.1 比例，每管加入对应量的 Buffer R-II（至少加入 110 μL Buffer R-II），漩涡振荡 15-30 s，12,000×g 离心 5 min。
*建议在 4℃下离心。
 - 3b. 弃沉淀，取上清液加入 250 μL 异丙醇，混和均匀。进行第 5 步。
*防止吸到沉淀

【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。

*请按下面说明加入对应的量：

当使用的组织量小于 30 mg 时	R-T、R-II 和异丙醇的使用量减半
当使用的组织量大于 100 mg 时	R-T、R-II 和异丙醇的使用量按比例增加

2. 加 400 μL Buffer R-T，用移液枪枪头反复吹打 8-10 次。
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℃下离心。
4. 弃沉淀，取上清液加入 250 μL 异丙醇，混和均匀。进行第 5 步。
*防止吸到沉淀

