

AxyPrep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.	AP-MN-MS-RNA-4	AP-MN-MS-RNA-50	AP-MN-MS-RNA-250
Kit size	4 preps	50 preps	250 preps
Spin/vac mini column	4	50	250
2 ml Microfuge tube	4	50	250
1.5 ml Microfuge tube	8	100	500
Buffer R- I	3 ml	25 ml	125 ml
Buffer R- II	1 ml	10 ml	50 ml
Buffer W1A concentrate	2.4 ml	24 ml	120 ml
Buffer W2 concentrate	2.4 ml	24 ml	2×72 ml
Buffer TE	1 ml	6 ml	30 ml
Protocol manual	1	1	1

Spin/vac mini column: 小量制备管。

Buffer R- I: 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，根据瓶上指定的体积加入乙醇，混合均匀，室温密闭贮存。可用无水乙醇或95%乙醇。

Buffer W2 concentrate: 去盐液。使用前，根据瓶上指定的体积加入乙醇，混合均匀，室温密闭贮存。可用无水乙醇或95%乙醇。

Buffer TE: 洗脱液。10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5。室温密闭贮存。

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】

1. 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

2. 加入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. 加入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，加入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，制备管中加入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，制备管中加入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，加入 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，沿管壁四周加入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. 加入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. 加入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，加入 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，制备管中加入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，制备管中加入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1min。

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，加入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，沿管壁四周加入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. 加入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. 加入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，加入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, 每孔加入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. 加入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, 加入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, 制备管中加入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, 制备管中加入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, 加入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, 沿管壁四周加入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×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或RNase-free水。
- 10B. 室温静置 1 min，12,000×g 离心 1 min，洗脱得 RNA。

【从细菌中提取总RNA】

1. 收集 $0.5-2 \times 10^9$ 的细菌，6,000×g离心10 min，弃上清。用50 μl 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 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. 加入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. 加入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. 取上清至1.5 ml离心管中，加入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℃下离心。
- 6A. 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，制备管中加入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，制备管中加入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，加入 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，沿管壁四周加入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或RNase-free水。

10B. 室温静置 1 min，12,000 \times 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 - 2×10^7 的酵母细胞，6,000 \times g离心10 min，弃上清。用50 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. 加入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. 加入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，加入250 μ l 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 $0.5-2 \times 10^7$ 的酵母细胞到 1.5 ml 离心管中， $6,000 \times g$ 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。 $3,000 \times g$ 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. 加入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。

3b. 加入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°C下离心。

4b. 取上清至1.5 ml离心管中，加入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°C下离心。

6A. 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，制备管中加入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，制备管中加入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，加入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，沿管壁四周加入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 μl Buffer TE 或 RNase-free 水。

10B. 室温静置 1 min， $12,000\times g$ 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. 加入 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. 加入 150 μl Buffer R- II，漩涡振荡 15-30 s， $12,000\times g$ 离心 5 min。

* 建议在 4°C 下离心。

4. 取上清至 1.5 ml 离心管中，加入 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， $6,000\times g$ 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，制备管中加入 500 μl 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，制备管中加入 700 μl Buffer W2， $12,000\times g$ 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， $12,000\times g$ 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 μl Buffer TE 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, 加入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, 沿管壁四周加入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或RNase-free水。

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

五、操作流程图

加入样品和 400 μ l Buffer R-I



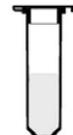
裂解

加入 150 μ l Buffer R-II
12,000 \times g 离心 5 min



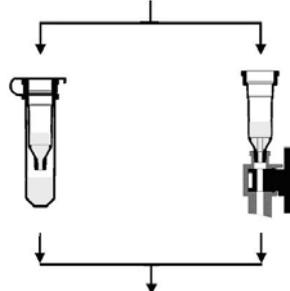
中和

加入 250 μ l 异丙醇



结合

加入 500 μ l Buffer W1A
加入 700 μ l Buffer W2
加入 700 μ l Buffer W2



结合

洗涤

加入 70-100 μ l Buffer TE
(或 RNase-free 水)



洗脱