

AxyPrep 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.	AP-MX-MS-RNA-2	AP-MX-MS-RNA-10	AP-MX-MS-RNA-25
制备次数	2 preps	10 preps	25 preps
Maxiprep RNA column	2	10	25
Lysate Filtration column	2	10	25
Buffer R- I	40 ml	180 ml	450 ml
Buffer R- II	15 ml	70 ml	160 ml
Buffer W1A concentrate	24 ml	120 ml	288 ml
Buffer W2 concentrate	24 ml	120 ml	2×150 ml
Buffer TE (nuclease-free)	6 ml	30 ml	80 ml
说明书	1	1	1

Maxiprep RNA column: 大量制备管。室温密闭贮存。

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

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，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 (nuclease-free): 洗脱液。10 mM Tris-Cl, 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 0.4g 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 1.2g 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。

2. 加16ml 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6ml Buffer R- II ，漩涡振荡15-30 s，8,000×g离心10 min。
* 建议在4℃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10ml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℃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15ml 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 15ml 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20ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用10ml 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 50ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。
- 9B. 将制备管放入一干净的50ml离心管中，在制备管膜中央加2ml 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。

【从植物组织中提取总RNA】

1. 取0.4-1.5 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：

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 0.4g 时	R- I， R- II 和异丙醇的用量都减半
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。

2. 加16ml 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。
3. 加6ml Buffer R- II，漩涡振荡15-30 s，8,000×g离心10 min。
* 建议在 4℃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10ml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℃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15ml 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 15ml 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20ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用10ml 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 50ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。
- 9B. 将制备管放入一干净的50ml离心管中，在制备管膜中央加2ml 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 0.5×10^8 - 1×10^9 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 1×10^8 - 5×10^8 的细胞，2,000×g离心5 min，弃上清。
2. 加16ml 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6ml Buffer R- II，漩涡振荡15-30 s，8,000×g离心10 min。
* 建议在4℃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10ml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15ml 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 15ml 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20ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用10ml 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 50ml 离心管中， $8,000\times g$ 离心 5 min。
- 9B. 将制备管放入一干净的50ml离心管中，在制备管膜中央加2ml 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。

【从细菌中提取总RNA】

- 收集 $1-6\times 10^{10}$ 的细菌， $6,000\times g$ 离心10 min，弃上清。用200 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， $1\times 10^9/\text{ml}$ 细菌的 $\text{OD}_{600}\approx 1$ 。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。
- 加16ml 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6ml Buffer R- II，漩涡振荡15-30 s， $8,000\times g$ 离心10 min。

* 建议在 4℃ 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10ml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℃ 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15ml 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 15ml 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20ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用10ml 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 50ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。

- 9B. 将制备管放入一干净的 50ml 离心管中，在制备管膜中央加 2ml 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 $0.5-1 \times 10^9$ 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16ml Buffer R- I，用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次，转入50ml离心管中。
- 3a. 加6ml 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50ml 离心管中，加10ml 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 $0.5-1 \times 10^9$ 的酵母细胞到 50ml 离心管中， $6,000 \times g$ 离心 10 min，弃上清。用 10ml 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16ml Buffer R- I，用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次，转入50ml离心管中。
- 3b. 加6ml 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50ml离心管中，加10ml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 15ml 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×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 15ml 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20ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用10ml 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 50ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。
- 9B. 将制备管放入一干净的 50ml 离心管中，在制备管膜中央加 2ml 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16ml 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6ml Buffer R- II，漩涡振荡15-30 s，8,000×g离心5 min。
* 建议在 4℃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10ml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℃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15ml 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 15ml 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20ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用10ml 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 50ml 离心管中，8,000×g 离心 5 min。

9B. 将制备管放入一干净的50ml离心管中，在制备管膜中央加 2ml 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

加样品和 16ml Buffer R-I

裂解

加 6ml Buffer R-II
8,000×g 离心 10 min

中和

转移上清至过滤柱中
推注收集滤过液

DNA、蛋白质去除

加 10ml 异丙醇

结合

加 15ml Buffer W1A
加 20ml Buffer W2
加 10ml Buffer W2

结合
洗涤

加 2ml Buffer TE (nuclease-free)
(或 RNase-free 水)

洗脱

