

AxyPrep 总RNA中量制备试剂盒

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-MD-MS-RNA-2	AP-MD-MS-RNA-10	AP-MD-MS-RNA-25
制备次数	2 preps	10 preps	25 preps
Midiprep RNA column	2	10	25
Lysate Filtration column	2	10	25
1.5 ml 离心管	4	20	50
塑料扳手	1	1	1
Buffer R- I	10 ml	50 ml	125 ml
Buffer R- II	4 ml	20 ml	50 ml
Buffer W1A concentrate	7.2 ml	48 ml	96 ml
Buffer W2 concentrate	9.6 ml	48 ml	2×72 ml
Buffer TE (nuclease-free)	6 ml	6 ml	10 ml
说明书	1	1	1

Midiprep RNA column: 中量制备管。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。

2. 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30-300 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 300 mg
RNA 含量低的组织 (如肌肉)	不超过 500 mg
当使用的组织量小于 100 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 300 mg 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4ml Buffer R- I ，用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次，转入15 ml离心管中。
3. 加1.5ml 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15 ml离心管中，滤过液加2.5ml异丙醇，混和均匀。
5. 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。
6. 保持负压，加5ml 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。
7. 保持负压，沿管壁四周加7ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用7ml 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。
8. 用塑料扳手取下中量制备管下部含基质的制备管，置于1.5 ml 离心管中12,000×g离心1 min。
9. 将制备管放入一干净的1.5ml离心管中，在制备管膜中央加0.3ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free水。
- 10.室温静置1 min，12,000×g离心1 min，洗脱得RNA。

【从植物组织中提取总RNA】

1. 取80-500 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 80-500 mg
植物纤维组织	通常用量 150-750mg
当植物叶组织量小于 200 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 400 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 500 mg 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4ml Buffer R- I ，用装有18-23号针头的注射器反复抽吸8-10次，转入15 ml离心管中。

3. 加1.5ml 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15 ml离心管中，滤过液加2.5ml异丙醇，混和均匀。

5. 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。

6. 保持负压，加5ml 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。

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

8. 用塑料扳手取下中量制备管下部含基质的制备管，置于1.5 ml 离心管中12,000×g离心1 min。

9. 将制备管放入一干净的1.5ml离心管中，在制备管膜中央加0.3ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free水。

10. 室温静置1 min，12,000×g离心1 min，洗脱得RNA。

【从细胞中提取总RNA】

本方案适用于从 1×10^7 - 2×10^8 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 1×10^7 ，R-I，R-II和异丙醇用量减半。如果细胞数大于 2×10^8 ，R-I，R-II和异丙醇按比例增加。

1. 收集 1×10^7 - 2×10^8 的细胞，2,000×g离心5 min，弃上清。

2. 加4ml Buffer R- I ，用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次，转入15 ml离心管中。

3. 加1.5ml 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15 ml离心管中，滤过液加2.5ml异丙醇，混和均匀。
5. 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。
6. 保持负压，加5ml 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。
7. 保持负压，沿管壁四周加7ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用7ml 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。
8. 用塑料扳手取下中量制备管下部含基质的制备管，置于1.5 ml 离心管中12,000×g离心1 min。
9. 将制备管放入一干净的1.5ml离心管中，在制备管膜中央加0.3ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free水。
10. 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 2×10^9 - 1×10^{10} 的细菌，6,000×g离心10 min，弃上清。用100 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 2×10^9 ，R-I，R-II和异丙醇用量减半。如果细菌量大于 1×10^{10} ，R-I，R-II和异丙醇按比例增加。
2. 加4ml Buffer R-I，用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次，转入15 ml离心管中。
3. 加1.5ml 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15 ml离心管中，滤过液加2.5ml异丙醇，混和均匀。
5. 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。
6. 保持负压，加5ml 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。
7. 保持负压，沿管壁四周加7ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用7ml 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。
8. 用塑料扳手取下中量制备管下部含基质的制备管，置于1.5 ml 离心管中12,000×g离心1 min。
9. 将制备管放入一干净的1.5ml离心管中，在制备管膜中央加0.3ml Buffer TE (nuclease-free) 或

RNase-free水。

10. 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 2×10^7 - 5×10^8 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 2×10^7 , R-I, R-II和异丙醇用量减半。如果酵母量大于 5×10^8 , 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 2×10^7 - 5×10^8 的酵母细胞, 6,000×g离心10 min, 弃上清。用100 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4ml Buffer R- I, 用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次, 转入15ml离心管中。

3a. 加1.5ml Buffer R- II, 漩涡振荡15-30 s, 8,000×g离心10 min。

* 建议在4℃下离心。

4a. 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15 ml离心管中, 滤过液加2.5ml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 2×10^7 - 5×10^8 的酵母细胞到 15ml 离心管中, 6,000×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℃ 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4ml Buffer R- I, 用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次, 转入15ml离心管中。

3b. 加1.5ml Buffer R- II, 漩涡振荡15-30 s, 8,000×g离心10 min。

* 建议在4℃下离心。

4b. 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15 ml离心管中, 滤过液加2.5ml异丙醇, 混和均匀。

步骤 5-10 为 a (机械法) 或 b (酶法) 两种实验方法共用

5. 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。
6. 保持负压，加5ml 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。
7. 保持负压，沿管壁四周加7ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用7ml 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。
8. 用塑料扳手取下中量制备管下部含基质的制备管，置于1.5 ml 离心管中12,000×g离心1 min。
9. 将制备管放入一干净的1.5ml离心管中，在制备管膜中央加0.3ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free水。
10. 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100-500 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 100mg 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 500mg 时	R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加

2. 加4ml Buffer R- I，用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次，转入15 ml离心管中。
3. 加1.5ml 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15 ml离心管中，滤过液加2.5ml异丙醇，混和均匀。
5. 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。
6. 保持负压，加5ml 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。
7. 保持负压，沿管壁四周加7ml Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用7ml 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。
8. 用塑料扳手取下中量制备管下部含基质的制备管，置于1.5 ml 离心管中12,000×g离心1 min。
9. 将制备管放入一干净的1.5ml离心管中，在制备管膜中央加0.3ml Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free水。
10. 室温静置1 min，12,000×g离心1 min，洗脱得RNA。

五、流程图

加样品和 4ml Buffer R-I

裂解

加 1.5ml 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 2.5ml 异丙醇

结合

加 5ml Buffer W1A
加 7ml Buffer W2
加 7ml Buffer W2

结合

洗涤

加 0.3ml Buffer TE (nuclease-free)
(或 RNase-free 水)

洗脱

