

总RNA小量制备试剂盒

货号：**K101-01**

保存：室温保存

货号	规格
K101-01	50 preps

【产品概述】

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、Primer Extension、体外翻译、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。

【产品组成】

Component	K101-01
RNase-free 吸附柱制备管	50
2 ml 收集管	50
1.5 ml RNase-free离心管	100
Buffer R1	25 ml
Buffer R2	10 ml
Buffer W1	24 ml
Buffer W2	24 ml
Buffer TE (DNase和RNase-free)	6 ml

Buffer R1：细胞裂解液。室温密闭贮存。

Buffer R2：中和液。室温密闭贮存。

Buffer W1：洗涤液。使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。混合均匀，室温密闭贮存。

Buffer W2：去盐液。使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。混合均匀，室温密闭贮存。

Buffer TE（DNase和RNase-free）：洗脱液。10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH7.5。室温密闭贮存。

注：Buffer R1和Buffer W1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。

【实验准备】

- 第一次使用时，在Buffer W1和Buffer W2中按试剂瓶上指定体积加入无水乙醇。
- 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。

【操作步骤】

● 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	R1, R2和异丙醇的使用量都减半
当使用的组织量大于40 mg时	R1, R2和异丙醇的使用量按比例增加

- 加400 μl Buffer R1，用1 ml枪头反复吹打10-15次，转入1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中。
- 加150 μl Buffer R2，漩涡振荡15-30 s，12,000×g离心5 min。
* 建议在4℃下离心。
- 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，步骤详见第IV页）

- 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。

- 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，制备管中加500 μl Buffer W1，12,000×g离心1 min。
* 确认在Buffer W1中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 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中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

- 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，12,000×g离心1 min。
- 将制备管放入新的1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加50-100 μl Buffer TE（DNase和RNase-free）或RNase-free水。
- 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

- 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	R1, R2和异丙醇的使用量都减半
当植物叶组织量大于80 mg时	R1, R2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	R1, R2和异丙醇的使用量按比例增加

- 加400 μl Buffer R1，用1 ml枪头反复吹打10-15次，转入1.5 ml离心管中（试剂盒内提供）。
- 加150 μl Buffer R2，漩涡振荡15-30 s，12,000×g离心5 min。
* 建议在4℃下离心。
- 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，步骤详见第IV页）

- 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×g离心1 min。
* 建议在4℃下离心。
- 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，制备管中加500 μl Buffer W1，12,000×g离心1 min。
* 确认在Buffer W1中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 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中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

- 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，12,000×g离心1 min。
- 将制备管放入新的1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加50-100 μl Buffer TE（DNase和RNase-free）或RNase-free水。
- 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

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

- 悬浮培养的动物细胞或从培养皿、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：**
 - 收集 2×10^6 - 1×10^7 的细胞，2,000×g离心5 min，弃上清。
 - 加400 μl Buffer R1，用1 ml枪头反复吹打10-15次，转入1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中。
 - 加150 μl Buffer R2，漩涡振荡15-30 s，12,000×g离心5 min。
* 建议在4℃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。

- 96-孔，24-孔，12-孔，或6-孔培养板上贴壁培养的细胞：**

- 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 μl Buffer R1，用移液枪上下吹打8-10次。
- 转移上述细胞悬浮液到1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中，用1 ml枪头反复吹打10-15次。
- 加110 μl Buffer R2，漩涡振荡15-30 s，12,000×g离心5 min。
* 建议在4℃下离心。
- 取上清至1.5 ml离心管中，加200 μl异丙醇，混和均匀。

步骤5-10可选择离心法（或负压法，步骤详见第IV页）

- 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。
- 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，制备管中加500 μl Buffer W1，12,000×g离心1 min。
* 确认在Buffer W1中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 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中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，12,000×g离心1 min。
- 将制备管放入新的1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加50-100 μl Buffer TE（DNase和RNase-free）或RNase-free水。
- 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

- 收集 0.5 - 2×10^9 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OD600≈1。如果细菌量小于 0.5×10^9 ，Buffer R1, Buffer R2和异丙醇用量减半。如果细菌量大于 2×10^9 ，Buffer R1, Buffer R2和异丙醇按比例增加。
- 加400 μl Buffer R1，用1 ml枪头反复吹打10-15次，，转入1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中。
- 加150 μl Buffer R2，漩涡振荡15-30 s，2,000×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250 µl异丙醇，混和均匀。

步骤5-10可选择离心法（或负压法，步骤详见第IV页）

5. 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。

6. 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，制备管中加500 µl Buffer W1，12,000×g离心1 min。

* 确认在Buffer W1中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

7. 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中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

8. 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，12,000×g离心1 min。

9. 将制备管放入新的1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加50-100 µl Buffer TE（DNase和RNase-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2×10⁶-5×10⁷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，3×10⁷/ml酵母细胞的OD600≈1。如果酵母量小于5×10⁶，Buffer R1，Buffer R2和异丙醇用量减半。如果酵母量大于2×10⁷，Buffer R1，Buffer R2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0.5-2×10⁷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 R1，用1 ml枪头反复吹打10-15次，转入1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中。

3a. 加150 µl Buffer R2，漩涡振荡15-30 s，12,000×g离心5 min。

* 建议在4℃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：

• 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0.5-2×10⁷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℃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1×10⁷酵母细胞加50单位计算。

2b. 加400 µl Buffer R1，用1 ml枪头反复吹打10-15次，转入1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中。

3b. 加150 µl Buffer R2，漩涡振荡15-30 s，12,000×g离心5 min。

* 建议在4℃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，步骤详见第IV页）

5. 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。

6. 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，制备管中加500 µl Buffer W1，12,000×g离心1 min。

* 确认在Buffer W1中已按试剂瓶上指定的体积加无水乙醇。

7. 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中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

8. 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，12,000×g离心1 min。
9. 将制备管放入新的1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加50-100 µl Buffer TE（DNase和RNase-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	R1，R2和异丙醇的使用量都减半
当使用的组织量大于100 mg时	R1，R2和异丙醇的使用量按比例增加

2. 加400 µl Buffer R1，用1 ml枪头反复吹打10-15次，转入1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中。

3. 加150 µl Buffer R2，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250 µl异丙醇，混和均匀。

步骤5-10可选择离心法（或负压法，步骤详见第IV页）

5. 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。

6. 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，制备管中加500 µl Buffer W1，12,000×g离心1 min。

* 确认在Buffer W1中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

7. 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中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

8. 弃滤液，将制备管置回到2 ml离心管中，12,000×g离心1 min。
9. 将制备管放入新的1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加50-100 µl Buffer TE（DNase和RNase-free）或RNase-free水。

10. 室温静置1 min，12,000×g离心1 min，洗脱得RNA。

负压法步骤：

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500 µl Buffer W1，吸尽管中溶液。

*确认在Buffer W1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。

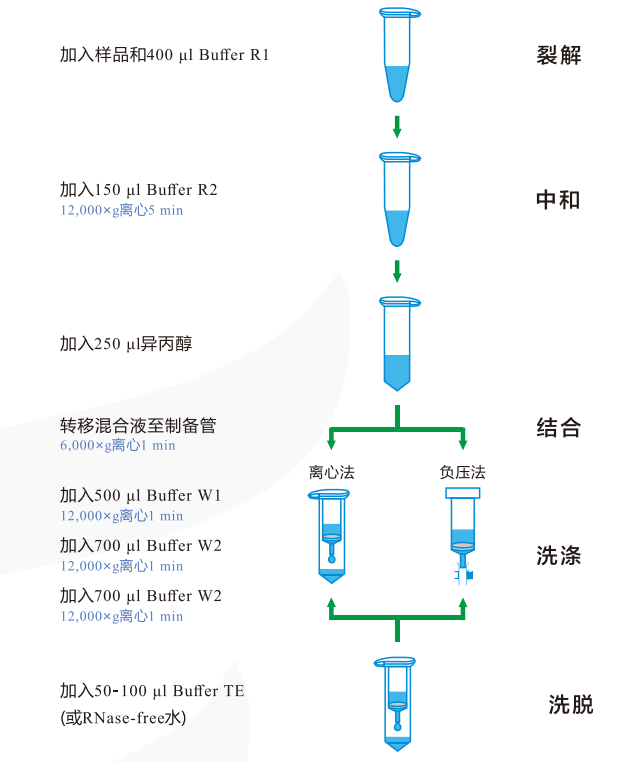
*确认在Buffer W2中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

8. 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。

9. 将制备管放入新的1.5 ml离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加50-100 µl Buffer TE（DNase和RNase-free）或RNase-free 水。

10. 室温静置1 min，12,000×g离心1 min，洗脱得RNA。

【操作流程图】



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。



■ 蓉为基因/Exongen Biotech Co., Ltd
■ 咨询热线/400-0800-717
■ 技术支持/support@exongen.com

■ 网址/www.exongen.com
■ 销售/sales@exongen.com
■ 售后/service@exongen.com