

提示：离心后，如果在上清液表面形成一层固体状物时，只要在吸取上清前用枪头将固体状物拨到离心管一边即可。

- 加入 0.5 倍上清液体积的无水乙醇，用移液器快速吹打 20-25 次，使液体成淡蓝色浑浊状且有白色泡沫（建议使用 1ml 移液器，调至 500 μ l 量程进行快速吹打），注：无水乙醇必须和上清液彻底混匀，若混匀不均会影响最终得率。
- 取出离心柱 / 收集管（离心柱已安放在收集管上）。
- 将混合物转移至离心柱中，如果混合物体积过大，可分两次上样过柱。12000-14000 \times g 离心 1 分钟，弃滤液。
- 加 600 μ l RNA 洗液，12000-14000 \times g 离心 45 秒，弃滤液。
- 根据下表准备 DNA 酶 I 孵育液，以下是提取一管 RNA 需要的用量。

表 2. DNA 酶 I 孵育液

试剂	体积
10XDNA 酶 I 缓冲液	5 μ l
DNA 酶 I	5 μ l
无核酸酶水	40 μ l

注意：轻轻混匀，不要振荡。

- 加入 50 μ l DNA 酶 I 孵育液到吸附膜中央，室温放置 15 分钟。
- 加入 600 μ l RNA 洗液，12000-14000 \times g 离心 45 秒，弃滤液。
- 加入 600 μ l RNA 洗液，12000-14000 \times g 离心 45 秒，弃滤液。将离心柱重新安置于收集管上，12000-14000 \times g 离心 2 分钟。
- 将离心柱转移至洗脱管上（试剂盒提供），在离心柱膜中央加入 50-200 μ l 无核酸酶水，室温静置 2 分钟，12000-14000 \times g 离心 1 分钟，将 RNA 保存在 -70 $^{\circ}$ C。

提示：如果将第一次洗脱下来的洗脱液重新加回到离心柱中央，室温静置 2 分钟，12000-14000 \times g 离心 1 分钟再次洗脱 RNA，可以提高 RNA 得率。

表 3. 不同材料提取 RNA 参考得率

样品种类	样品名称	RNA 收获 (μ g/mg)	A260/A230	A260/A280
动物组织	小鼠肝脏	3.0-5.5	2.0-2.5	1.9-2.1
	小鼠肾脏	1.5-3.0	2.0-2.5	1.9-2.1
	小鼠脾脏	1.5-3.5	2.1-2.6	1.9-2.1
	小鼠心脏	0.4-1.0	2.0-2.6	1.9-2.1
	小鼠肺	0.6-1.2	2.2-3.0	1.9-2.1
	小鼠脑	0.4-0.8	2.1-2.7	1.9-2.1
植物组织	番茄叶片	1.0-2.0	2.1-2.6	1.9-2.2
细胞	293T(1 \times 10 ⁶)	8-10/ 次	2.0-2.3	1.9-2.1
	Hela cell(1 \times 10 ⁶)	20/ 次	2.0-2.3	1.9-2.1
细菌	<i>E. Coli</i> (1 \times 10 ⁹)	30-50/ 次	2.2-2.6	1.9-2.1

附：相关缓冲液和溶液的配方见技术手册。

Eastep[®] Super总RNA提取试剂盒简易说明书

目录号：LS1040



对初次使用本试剂盒的客户，请参照详细技术手册进行操作，下载网址：
www.promega.com.cn

产品描述：

Eastep[®] Super 总 RNA 提取试剂盒为客户提供了一套从动物组织、植物组织、培养细胞、细菌中小量纯化高质量、完整总 RNA 的解决方案。该试剂盒采用独特的细胞裂解系统，无需使用苯酚、氯仿等有害物质，通过离心柱硅基质膜高效、专一地吸附核酸分子，再经 DNA 酶处理去除基因组 DNA 的污染，最终得到高纯度的总 RNA。

试剂盒内容：

目录号	LS1040	
名称	Eastep [®] Super Total RNA Extraction Kit	50 次
组份名称	规格	
• RNA 裂解液	40ml	
• RNA 稀释液	30ml	
• RNA 洗液	40ml	
• 10XDNA 酶 I 缓冲液	0.3ml	
• DNA 酶 I (冻干粉)	1 瓶	
• 1- 硫代甘油	1ml	
• 无核酸酶水	13ml	
• 离心柱 / 收集管 (50 套 / 包)	1 包	
• 洗脱管 (50 个 / 包)	1 包	
• 说明书	1 份	

储存条件：

在收到试剂盒后，建议将其中的 10XDNA 酶 I 缓冲液和 1- 硫代甘油于 4 $^{\circ}$ C 保存。其它组份于 +15 $^{\circ}$ C 到 +30 $^{\circ}$ C 保存。配制好的 DNA 酶 I 分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存，加入 1- 硫代甘油的 RNA 裂解液于 +4 $^{\circ}$ C 保存可至 6 个月。

配制试剂：在准备提取 RNA 操作之前，先准备好下列 3 种溶液：

- DNA 酶 I：将 550 μ l 无核酸酶水（试剂盒已提供）加入到 DNA 酶 I（冻干粉）瓶中。
- 注意：**用移液器轻轻吹打混匀，不要震荡。建议将溶解后的 DNA 酶 I 分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。



- RNA 裂解液：将 1- 硫代甘油按 2% (V/V) 加入到 RNA 裂解液中，配制好的裂解液盖紧瓶盖并做好标记。
- RNA 洗液：将 70ml 无水乙醇加入到 40ml 的 RNA 洗液中，盖紧瓶盖并做好标记，本产品呈淡黄色属正常现象。

操作方法：

一 样品裂解物的制备

在实验之前，请参考下表中所示的各种样品最适起始用量，进行裂解物制备。

表 1. 不同样品最适起始用量和裂解液，稀释液的使用量

样品名称	样品起始用量	裂解液使用量	稀释液使用量
普通动物组织 (肝脏, 肾脏, 心, 肺, 脑等)	5-20mg	300μl	300μl
普通动物组织 (肝脏, 肾脏, 心, 肺, 脑等)	20-40mg	500μl	500μl
特殊动物组织 (脾脏等)	5-10mg	300μl	300μl
悬浮、或贴壁细胞	1.5×10 ⁹ -5×10 ⁶	300μl	300μl
植物组织 (叶片, 茎)	30-50mg	300μl	300μl
植物组织 (叶片, 茎)	50-100mg	500μl	500μl
细菌 OD ₆₀₀ 达 0.6-1.0 时	1ml	200μl	300μl

注意：

- 在制备样品裂解物时，如果制备的裂解物很粘稠（如，脾脏，细胞）不易吸取时，可以使用 20G（或国产 9 号注射针头）的注射器来回吸放数次，以便于裂解物的吸取。
- 制备好的裂解物可以保存于 -70℃ 备用。

动物组织裂解物的制备

按照以下两种方法进行裂解物的制备：

1. 必须使用新鲜或超低温冻存的组织。迅速将组织放入无核酸酶的 1.5ml EP 管或匀浆管中，按起始用量加入 RNA 裂解液（按上表推荐用量），置冰浴中，用组织匀浆器破碎细胞。
2. 必须使用新鲜或超低温冻存的组织。迅速将组织投入到已加入液氮的研钵中进行研磨，研磨过程中要不断补充液氮，以防止组织融化，直至组织完全研磨成粉末状。将研磨成粉末状的样品迅速转移到无核酸酶的 EP 管中称量，待剩余液氮将要挥发尽时加入裂解液（按上表推荐用量），用移液枪反复吹打直到裂解物中无明显块状组织。

植物组织裂解物的制备：参照动物组织裂解物的制备第 2 点，液氮破碎细胞的方法。

细胞裂解物的制备

1. **贴壁细胞裂解物的制备：**贴壁细胞样品可按下列两种方法之一制备。第一种方法用胰酶 - EDTA 溶液使细胞松动脱落；第二种方法手动刮取细胞。

1) 胰蛋白酶处理方法：

- 倒掉培养基，用无菌 1×PBS 溶液洗涤细胞，然后加入正好能盖住单层细胞的胰酶溶液：如 150mm 培养瓶需加入 2ml 胰酶溶液，100mm 培养皿需加入 1ml 胰酶溶液。轻轻晃动

器皿使胰酶均匀分布在细胞层上，直到细胞松动（一般 1-2 分钟）。

- 一旦细胞松动，尽快弃去胰酶溶液（倾斜平皿或培养瓶以使用枪头尽量吸去多余的溶液），加入 1×PBS 溶液，用移液枪吹下贴壁的细胞。
- 将细胞连同 PBS 溶液一起收集到无核酸酶的 EP 管中，300-500×g (~1100-1500 rpm) 离心 5 分钟，弃上清，收集沉淀细胞。
- 按起始用量加入 RNA 裂解液（按上表推荐用量），用移液枪吸放打散沉淀，混匀，并将裂解物转移至 1.5ml 无核酸酶 EP 管中。

2) 刮取式分离方法：

- 倒掉培养基，加入适量无菌 1×PBS 溶液，用移液枪吹打细胞，直到细胞全部脱离瓶底为止。对于贴壁牢固的培养细胞，可以用细胞刮勺剥离细胞。
- 将细胞连同 PBS 溶液一起收集到无核酸酶的 EP 管中，300-500×g (~1100-1500 rpm) 离心 5 分钟，弃上清，收集沉淀细胞。
- 按起始用量加入 RNA 裂解液（按上表推荐用量），用移液枪吸放打散沉淀，混匀，并将裂解物转移至 1.5ml 无核酸酶 EP 管中。

2. 悬浮细胞裂解物的制备：

- 将悬浮的细胞连同培养液一起倒入无核酸酶的 EP 管中，300-500×g (~1100-1500 rpm) 离心 5 分钟。使用无菌 1×PBS 溶液洗涤沉淀的细胞，300-500×g (~1100-1500 rpm) 离心 5 分钟，弃上清，收集沉淀的细胞。
- 按起始用量加入 RNA 裂解液（按上表推荐用量），用枪头吸放打散沉淀，混匀，并将裂解物转移至 1.5ml 无核酸酶的 EP 管中。

细菌裂解物的制备

- 在合适的培养基、合适的温度中过夜培养细菌。第二天，按 1:50 的比例接种并培养至 OD₆₀₀ 达 0.6-1.0，可能只需要几小时，如果生长太慢，可以加大接种量。
- 向 1.5ml 离心管中加入 1ml 细菌培养液，12000-14000×g 离心 2 分钟。
- 小心地、尽可能多地除去上清，留下细菌沉淀。
- 用 100μl 新鲜配置的含溶菌酶的 TE 缓冲液重悬沉淀。革兰氏阳性细菌可使用 3mg/ml（终浓度）的溶菌酶；革兰氏阴性细菌则可采用 0.4mg/ml（终浓度）的溶菌酶，轻轻敲打混匀。
- 室温孵育，革兰氏阳性菌孵育 5-10 分钟；革兰氏阴性菌孵育 3-5 分钟。加入 200μl RNA 裂解液，混匀。

二 RNA 的提取

- 在表 1 中所述的样品类型的裂解物中，按不同样品最适起始用量及裂解液，稀释液的用量加入 RNA 稀释液，用移液枪混匀，室温放置 3-5 分钟。
- 提示：**如果样品（指动物组织和细胞）来源比较珍贵，可以选择裂解物加入稀释液后置 70℃ 加热 3 分钟，可以提高 RNA 的得率。

- 动物组织裂解物、植物组织裂解物和细胞裂解物混匀后以 12000-14000×g 离心 5 分钟，小心吸取上清液。

细菌裂解物直接进行下一步操作，**不要离心**。

