

# Total RNA提取

## 1.细胞收集

细胞数量在 $10^2$  - $10^7$ 之间，悬浮细胞，低速离心收集 $10^2$ - $10^7$  细胞；贴壁细胞，小心倒出培养液。加入300ul(少量细胞几百)/600ul（几千以上） lysis/binding buffer，震荡或反复抽打，以至细胞裂解。

## 2. 组织制备

组织在0.5-250mg之间，从活体上取下的组织应在15分钟内用液氮浸没迅速降温，液氮运输。体积较小的组织最好用RNA later保存，干冰运输。

## 3. mirVana™ RNA Isolation Kit, AM1561 提取组织、细胞Total RNA

3.1 加入10倍体积的lysis/binding buffer（1ml lysis/binding buffer/0.1g 组织）匀浆器彻底混匀。

3.2 加入1/10体积的Homogenate additive，涡旋混匀，冰上放置10分钟。以上操作均在冰上。

3.3 加入与lysis（不计Homogenate additive）相同体积的acid-phenol: chloroform（300ul lysis/300ul acid-phenol: chloroform），涡旋30-60 秒，室温10,000g 离心5分钟，分相若不好，则需重新离心。取上清置一新管中，记体积。

3.4 加入1.25倍体积100%乙醇，涡旋混匀，反复过纯化柱，体积不超过700ul，10,000g离心15秒。

3.5 加入350ul wash 1，离心5~10秒，清洗纯化柱，10,000g离心15秒，弃过滤液。

3.6 DNase I 10ul和Buffer RDD70 μl加入膜上（QIAGEN#79254），20-30℃放置15分钟。

3.7 加入350ul wash 1，离心5~10秒，清洗纯化柱，10,000g离心15秒，弃过滤液。

3.8 加入500ul wash 2/3，离心5~10 秒，清洗纯化柱二次，10,000g离心15 秒，弃过滤液,离心1分钟。

3.9 将离心柱放置到新的收集管中，柱中心加入100μL 95℃预热的Elution Solution 或 nuclease-free水，室温最高转速离心20-30秒，收集管中液体即为提取的Total RNA，可放置在-70℃保存。

#### **4. mirVana™ PARIS™ Kit, Ambion-1556 提取血清、血浆、体液等Total RNA**

- 4.1 取适量的血浆400ul（最多可抽800 μl，不足100 μl时，用Cell Disruption Buffer补至100 μl），加入等量的2×Denaturing Solution，涡旋混匀，冰上放置5分钟。
- 4.2 加入等体积的酚/氯仿，涡旋混匀30-60秒，室温，最高转速离心5分钟。
- 4.3 小心吸取上清到新的1.5 ml离心管中，添加1.25倍体积的无水乙醇，涡旋混匀。
- 4.4 转移至柱子中（最大体积700ul），13000g，离心30s。
- 4.5 加入350μl miRNA Wash Solution 1到离心柱中，13000 g，室温离心15秒，弃流过液，将离心柱重新放置到收集管中。
- 4.6 混合10 μl DNase I和 70 μl Buffer RDD QIAGEN (#79254) 总体积：80 μl，加到离心柱中的膜上，室温放置 15 min。
- 4.7 加入350 μl miRNA Wash Solution 1到离心柱中，13000 g，室温离心15秒，弃流过液，将离心柱重新放置到收集管中
- 4.8 加入500 μl Wash Solution 2/3 过柱两次，空柱离心1分钟。将离心柱放置到新的收集管中，柱中心加100 μl 95℃预热的Elution Solution，室温最高转速离心20-30秒，收集管中的液体即为提取的Total RNA，可放置在-70℃保存。

#### **5. RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit, Ambion-1975 提取石蜡标本Total RNA**

- 5.1 加200μl Digestion Buffer，加4μl Protease，振荡混匀，快速离心。
- 5.2 50℃ 15min，振荡混匀，快熟离心；80℃ 15min，振荡混匀，快速离心。
- 5.3 每240μl I Solution Additive加550μl 无水乙醇。混匀。加入样品。
- 5.4 转移至柱子中（最大体积700ul），13000 g，离心15秒。倒去溶液。
- 5.5 加入350μl Wash I，13000 g，离心15秒。倒去溶液。
- 5.6 混合60ul溶液（6ul 10×Dnase Buffer,4ul Dnase,50ul Nuelease-free water）加到离心柱中的膜上，室温放置 30 min。
- 5.7 加入350μl Wash I，13000 g，离心15秒。倒去溶液。
- 5.8 加入500 μl Wash Solution 2/3，13000 g，离心15秒。倒去溶液。

5.9 加入500  $\mu$ l Wash Solution 2/3, 13000 g, 离心15秒。倒去溶液。

5.10 空柱离心1分钟。

5.11 将离心柱放置到新的收集管中, 柱中心加60  $\mu$ l Elution Solution (ES: 95度预热), 室温最高转速离心1分钟, 收集管中的液体即为提取的Total RNA, 可放置在-70℃保存。

## 6. RNAQUEOUS KIT, Ambion-1912提取植物Total RNA

6.1将研磨好的组织样品, 加入600  $\mu$ l Lysis/Drinding Solution, 加入120  $\mu$ l Plant RNA isolation Aid,振荡混匀。12000rpm, 5min, 4℃离心。

6.2取上清, 加等体积64%乙醇, 混匀或漩涡振荡。

6.3将溶液加入柱子中, (注意: 最多可加700  $\mu$ l) 室温, 13000rpm, 30s。

6.4加350 $\mu$ l miRNA Wash Solution 1到离心柱中, 10000 g, 室温离心15秒, 弃流过液, 将离心柱重新放置到收集管中。

6.5混合10  $\mu$ l DNase I和 70  $\mu$ l Buffer RDD QIAGEN (#79254) 总体积: 80  $\mu$ l, 加到离心柱中的膜上, 室温放置 15 min。

6.6加350  $\mu$ l miRNA Wash Solution 1到离心柱中, 10000 g, 室温离心15秒, 弃流过液, 将离心柱重新放置到收集管中

6.7 500  $\mu$ l Wash Solution 2/3 过柱两次, 空柱离心1分钟。将离心柱放置到新的收集管中, 柱中心加40~60  $\mu$ l 80℃预热的Elution Solution, 放置2min。室温最高转速离心20-30秒, 收集管中的液体即为提取的Total RNA, 可放置在-70℃保存。