**Total RNA提取**

**1.细胞收集**

细胞数量在102 -107之间，悬浮细胞，低速离心收集102-107 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. mirVanaTM 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，清洗纯化拄，10,000g离心15秒，弃过滤液。

3.6 DNase I 10μl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，清洗纯化拄，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10μl DNase I和 70 μl Buffer RDD QIAGEN (#79254) 总体积：80μl， 加到离心柱中的膜上，室温放置 15 min。

4.7 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

4.8 加入500μl 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100μl 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500μl Wash Solution 2/3，13000 g，离心15秒。倒去溶液。

5.9 加入500μl 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60μl 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600μl Lysis/Drinding Solution，加入120μl 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700μl）室温，13000rpm，30s。

6.4加350μl 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10μl DNase I和 70 μl Buffer RDD QIAGEN (#79254) 总体积：80μl， 加到离心柱中的膜上， 室温放置 15 min。

6.6加350μl 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 500μl 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40~60μl 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。

