# mirVana™ miRNA Isolation Kit提取总RNA方法（Ambion）

**1 实验目的**

本实验流程是适用于普通提取植物或培养细胞total RNA以及Small RNA的提取。对动物样品不太适用。作为客户提供新鲜样品提取RNA的标准操作指南所涉及的生产试验条件及过程必须严格按照本实验流程进行。

**2适用范围**

本试剂盒可从植物组织，特别是富含多糖多酚或淀粉的植物组织中快速提取总RNA，可同时处理大量不同样品。并且可以对small RNA进行过柱提取，从而对很多植物样本的Small RNA提取达到较好的效果。

**3 实验原理**

总RNA提取的原理就是通过裂解液将细胞裂解，释放出RNA，并通过过柱去除蛋白、多糖多酚等杂质，最终获得高纯度的RNA的过程。

**4 实验仪器**

高速离心机、水浴锅、振荡器

**5 试剂耗材**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| mirVana™ miRNA Isolation Kit | 1个 |
| 无水乙醇 | 1ml |
| 酚：氯仿 | 550μl |

6 操作步骤

1、试剂盒放在冰箱上层，取500ul lysis/Binding Buffer。

2、液氮中研磨样品，向lysis/Binding Buffer中加入50mg左右样品，涡旋混匀30s左右。

3、立即加入50ul miRNA Homogenate Additive，并在4度置10min。

4、加入550ul体积为1:1的酚：氯仿（吸下层，上层为水相，空枪吸），涡旋10s中混匀，13000rpm，5min离心。

5、吸上清于一新管，并加入1.25倍体积上清的无水乙醇，颠倒混匀，过Ambion柱子（每次最多加700ul，上清可分次过柱），10000rpm，离心15s。

6、去滤液，向柱子中加入700ul的miRNA Wash Solution 1，10000rpm，离心10s。

7、去滤液，向柱子中加入500ul的Wash Solution 2/3，10000rpm，离心10s，并去滤液。

8、重复步骤7，并将柱子转至新的管子中，室温晾1min。

9、加50ul的RNase Free ddH2O（在65度预热水可增加RNA洗脱效率），静置2min，10000rpm，离心10s。

10、回溶一次，10000rpm，离心2min。并在管壁标明体积。