# 提取草莓果实，但提取后有颜色，之后用Ambion kit纯化

**1, 脱色**

裂解液：600ul-CTAB，加入到2 mL的离心管中。分别取100~200 mg的苹果属植物组培苗的叶和茎放入研钵中，加入少量的PVP，液氮研磨充分后迅速加入裂解液中，然后依次加入等体积的水饱和酚(pH 4.5)，l／4体积的氯仿，3％的β-巯基乙醇，15％的无水乙醇。充分混匀，旋涡振荡3 min，4℃静置20 min；4℃，12 000 r／min离心7 min；取上清加入另一个2mL的离心管中，再加入等体积的水饱和酚，1／5体积的3 mol／L KAc，旋涡振荡4 min后，加入l／3体积的氯仿，充分混匀，4℃，12 000 r／min离心8 min；取上清，加人等体积的氯仿：异戊醇(24：1)，混匀，4℃，12 000 r／min离心10 min；取上清，重复2-3次，以蛋白不出现为止；加入2．5倍体积的无水乙醇和1／10体积的3 moL／LNaAc，充分混匀，-20℃或-70 ℃放置1 h；4℃，12 000 r／min离心15 min；弃上清，用75％的乙醇洗沉淀2次，室温干燥1~2min，根据沉淀大小加入适量 DEPC处理的ddH2O中，-70℃保存备用

**2， 纯化**

**1）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。

**2）实验仪器**

高速离心机、水浴锅、振荡器

**3）试剂耗材**

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

4）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。