# 异硫氰酸胍二步法标准化操作流程

**1 适用范围**

本标准操作规程适用于从富含多糖多酚及次生代谢物质的植物组织中提取总RNA，非此类样品RNA的提取流程与本标准操作规程不同，须按照其它样品RNA提取操作规程进行。

**成功提取样本组织：香蕉果肉**

**2 实验仪器设备**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 仪器名称 | 型号 | 厂家 |
| 高速离心机 | Micro 17R | Thermo |
| 水浴锅 | DK-8D | 上海合恒 |

**3 试剂和耗材**

**1）异硫氰酸胍二步法提取液**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 500mL | 终浓度 |
| 异硫氰酸胍固体 | 236.32g | 4mol/L |
| 柠檬酸三钠 | 3.67625g | 25mmol/L |
| 十二烷基肌氨酸钠（可用SDS代替） | 2.5g | 0.5%（w/v） |
| 可溶性聚乙烯吡咯烷酮（PVP） | 10g | 2%(w/v) |
| **注意：**所用水为经DEPC处理、高压灭菌后，方可用于配制；使用前每1mL抽提缓冲液加入5ulβ-巯基乙醇 | | |

**2）其他溶液**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 100ml | 500ml | 终浓度 |
| 醋酸钠(pH4.5-5.5) | 24.609g | 123.045g | 3mol/L |

**4操作步骤**

1. 取1.5mL离心管，加入900ulRNA抽提缓冲液；
2. 将液氮加入研钵使研钵预冷后，将组织放入液氮中快速研磨，迅速将组织研磨成尽可能细的粉末，取50-100mg加入裂解液中，于漩涡振荡器上混匀后置于冰上5min，再加入醋酸钠100ul，上下颠倒混匀；
3. 加入1mL氯仿，剧烈震荡将两相混匀，冰上放置10min后于4度12000g离心10min，取上清液置于新的离心管中；
4. 重复（3）中的氯仿抽提步骤1次；
5. 在上清液中加入1mL异丙醇，混匀后置于-20度30min，接着4度12000g离心15min获得RNA沉淀；

6) 用75%的乙醇溶液清洗沉淀2次，每次7500g离心5min，剩余的少量液体可再次离心收集，然后用枪头吸出弃掉。室温干燥5-10min，用DEPC处理过的ddH2O 1mL彻底溶解RNA沉淀；

7) 在RNA溶液中加入Tris饱和酚1mL，剧烈震荡将两相混匀，常温12000g离心10min，取上清液；

8) 在上清液中加入1mL氯仿，剧烈震荡混匀后，常温120000g离心10min，取上清液；

9) 在上清液中加入醋酸钠100ul和1mL异丙醇，混匀后于-20度中放置30min，4度12000g离心15min得到RNA沉淀；

10) 用75%的乙醇溶液清洗沉淀2次，每次7500g离心5min，剩余的少量液体可再次离心收集，然后用枪头吸出弃掉。室温干燥5-10min，用适量DEPC处理过的ddH2O 溶解沉淀，获得纯化后的RNA。