# 异硫氰酸胍法标准化操作流程

**1 适用范围**

本标准操作规程适用于次级代谢物较多的植物RNA提取，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：红豆杉树皮**

**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）异硫氰酸胍提取液**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 250ml | 500ml | 终浓度 |
| 异硫氰酸胍固体 | 118.16g | 236.32g | 4mol/L |
| 柠檬酸三钠 | 1.838g | 3.67625g | 25mmol/L |
| **注意：**所用水为经DEPC处理、高压灭菌后，方可用于配制；用时临时加入10%体积的β-巯基乙醇。 | | | |

**2）其他溶液**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 100ml | 500ml | 终浓度 |
| SDS溶液 | 10g | 50g | 10% |
| 醋酸钾 | 49.07g | 245.35g | 5M |
| 醋酸钠 | 24.609g | 123.045g | 3M |
| 酚仿醇 | 水饱和酚：氯仿：异戊醇=25：24：1（体积比），提取RNA使用的水饱和酚为酸性ph4.5。 | | |

**4操作步骤**

1. 取1.5mL离心管，加入1 mL异硫氰酸胍溶液待用，将无水乙醇预冷。
2. 将液氮加入研钵使研钵预冷后，将组织或细胞放入液氮中快速研磨，迅速将组织或细胞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，室温静置5min，期间不断振荡，让组织充分裂解。
3. 4℃，12000×g离心5min，将上层水相转入新的2.0ml EP管。
4. 顺序加入1/10 体积的醋酸钾、1/4 体积的100% 冰乙醇及1/10 体积的醋酸钠，每加入一种试剂都轻轻摇动离心管混合均匀。 之后将每个样品平均分成两管，加入等体积酚仿醇混合液，上下颠倒混匀后，室温静置3min。
5. 4℃，12000×g离心10min，将上清转移至新的离心管中，加入等体积氯仿，混匀室温静置3分钟。
6. 4℃，12000×g离心10min，将上清转移至新的离心管中，加入等体积异丙醇（可先将异丙醇预冷），室温放置10min。
7. 4℃，12000×g离心15min，弃上清（小心勿将沉淀倒出）。
8. 向RNA 沉淀中加入1ml 75％乙醇，漩涡振荡器上振荡混匀5s，4ºC，7500×g离心5min，弃上清。
9. 重复步骤8（如果为多管，可以用总量为1ml 的75%乙醇洗剂，将洗涤液及沉淀合到一个管中）。
10. 4ºC，7500×g离心1min，用枪头小心吸弃多余液体。

将RNA沉淀置于超净工作台吹干，约5-10min（不易太干，否则RNA很难溶解），用适量DEPC处理水溶解RNA沉淀**。**