实验前准备

1. 取适量TRK裂解液，按1ml裂解液加入20ul 2-疏基乙醇。该混合液可于室温放置一周。
2. 用DEPC水配置一小瓶70%乙醇。
3. 按下表用无水乙醇稀释RNA Wash Buffer II，并于室温保存。
   R6664-00：加入20ml无水乙醇
   R6664-01：每瓶加入48ml无水乙醇
   R6664-02：每瓶加入48ml无水乙醇

离心操作方案

1. 使用前每1ml TRK裂解液加入20ul 疏基乙醇。
   A. 悬浮培养细胞：离心收集细胞，倒弃溶液，弹松沉淀团，加入TRK裂解液吸打裂解细胞；
   B. 贴壁培养细胞：倒弃培养基，加入TRK裂解液至培养瓶中，吹打裂解细胞；
   C. 已沉淀的细胞：弹松细胞团，加入TRK裂解液吸打裂解细胞；
   进一步匀浆：细胞裂解后会形成非常粘稠的溶液，可用20#针头注射器抽打裂解液几次；
   <1x10^8 Cells, 2ml TRK/2-Me；
   D. 动物软组织：称取<200mg 组织样品，加入2ml TRK裂解液匀浆样品。室温5,000×g离心10min去除不溶解的的杂质，小心转移上清至15ml 离心管；
2. 加入等倍体积70%乙醇(2ml)至裂解液中，抽打或涡旋混匀。
3. 将柱子套在15ml管中，转移混合液至柱子中。室温4,000×g离心5min，弃去滤液。
   若混合液超过3.5ml，每次转移不超过3ml至柱子，然后重复该步骤至所有混合液都滤过柱子。
4. 把柱子套放新收集管中，加入3.5ml RNA Wash Buffer I 至柱子上，按以上条件离心，弃滤液。把柱套放回收集管中。若要进行膜上DNase 消化，按步骤5进行，否则直接转至第7步。
5. DNase 消化(可选)
   5A. 配制DNAse消化液(Digestion Buffer, 176ul；RNase-Free DNase I, 4ul)，混匀。
   5B. 将上述消化液转移至柱子膜的正中央，不要将消化液转移至柱子内壁。
   5C. 室温静置15分钟。
6. 加3.5ml RNA Wash Buffer I 至柱子，按以上条件离心，弃滤液。
7. 把柱套放回收集管中，加3.5ml RNA Wash Buffer II至柱子上，按以上条件离心，弃滤液。
8. 把柱套放回收集管中，加3.5ml RNA Wash Buffer II至柱子上，按以上条件离心，弃滤液。
9. 把柱套放回收集管中，5,000xg离心空柱5min 以甩干柱子基质。
10. 把柱子装在新的15ml 离心管上，加入250-500ul DEPC Water柱子基质上，室温静置2min。
    8,000xg离心3min洗脱出RNA。

快速流程图

培养细胞: <1x10^8:2ml TRK/2-Me
动物组织: <200mg Tissue:2ml TRK/2-Me

加入等体积70%乙醇 ， 涡旋混匀

上柱吸附RNA, (4,000xg,5min)

除蛋白质:3.5ml RNA Wash Buffer I洗涤;
可选:膜上180ul DNase消化, 15min@RT
除蛋白质:3.5ml RNA Wash Buffer I;
脱盐: 两次3.5ml RNA Wash Buffer II

洗脱:250-500ul DEPC Water

订货信息

品名	组织用量	最大结合力	货号和次数	价格
Total RNA Kit I	<5x10^{6}Cell 10-30mg	100 μg	R6834-00(5) R6834-01(50) R6834-02(200)	¥135 ¥900 ¥3500
Total RNA Midi Kit	<10^{8}Cell 200mg	1mg	R6664-00(2) R6664-01(10) R6664-02(25)	¥261 ¥675 ¥1620
Total RNA Maxi Kit	<5x10^{8}Cell 1g	5mg	R6693-01(5) R6693-02(20)	¥675 ¥2520
MicroElute Total RNA Kit	<5x10^{5}Cell <5mg	50 μg	R6831-00(5) R6831-01(50) R6831-02(200)	¥144 ¥1350 ¥4770
HP Total RNA Kit	5x10^{6}Cell <30mg	100 μg	R6812-00(5) R6812-01(50) R6812-02(200)	¥150 ¥1200 ¥3800