

第一部分

RNeasy Mini Kit (cat. 74104, 74106) 可以在室温 (15–25°C) 保存 9 个月。

此手册为简易操作指南，更多关于此试剂盒的信息请从 www.qiagen.com/handbooks 下载 RNeasy Mini Handbook 查阅。

如果需要更多技术支持，可拨打免费技术服务热线 800 988 0325 或 400-880-0325 咨询

实验前注意事项：

- 如果从富含 RNA 酶的细胞系或组织中纯化 RNA，请在每 1 ml Buffer RLT 中加入 10 μ l β -巯基乙醇或 20 μ l DTT。含 β -巯基乙醇或 DTT 的 Buffer RLT 可在室温下保存最多 1 个月。
- 在 Buffer RPE 中加入 4 倍体积乙醇 (96-100%)。
- 如果样品保存在 *RNAlater* 中，请用手术钳取出。

1. 细胞：收获不超过 1×10^7 个细胞并加入合适体积的 Buffer RLT (用量见表 1)，吹打均匀。

组织：不要超过 30 mg 的组织。加入合适体积的 Buffer RLT (用量见表 1) 并充分吹散使液体均一化。以最大速度离心裂解液 3 min。小心的吸取上清液以供下面步骤使用。

2. 加入与裂解液等体积的 70%乙醇，吹打均匀。不要离心，直接进入步骤 3。
3. 将最多 700 μ l 样品转移入已套上 2 ml 收集管的吸附柱 RNeasy Mini spin column (如有任何状态的沉淀需一起转移)，关上吸附柱盖子，以 $\geq 8000 \times g$ 转速离心 15 s。弃上清。

可选：如需要进行 DNA 酶消化，请在此步骤后按第二部分中“柱上 DNA 酶消化”步骤 1-4 流程继续实验

4. 在吸附柱内加入 700 μ l Buffer RW1，关上吸附柱盖子，以 $\geq 8000 \times g$ 转速离心 15 s。弃上清。
5. 在吸附柱内加入 500 μ l Buffer RPE，关上吸附柱盖子，以 $\geq 8000 \times g$ 转速离心 15 s。弃上清。
6. 在吸附柱内加入 500 μ l Buffer RPE，关上吸附柱盖子，以 $\geq 8000 \times g$ 转速离心 2 min。弃上清。

可选：把吸附柱转移到一个新的 2 ml 收集管中 (试剂盒内提供)，以最大速度离心 1 min。

7. 把吸附柱转移到一个新的 1.5 ml 收集管中 (试剂盒内提供)，在吸附柱中间的膜上加入 30-50 μ l 无 RNA 酶的水。关上吸附柱盖子，以 $\geq 8000 \times g$ 转速离心 1 min 洗脱 RNA。

8. 如果预期 RNA 产量 > 30 µg，用 30-50 µl 无 RNA 酶的水再洗脱一次；若希望获得高浓度的 RNA，可用步骤 7 中洗脱产物重复洗脱。所有洗脱产物都可保存在 步骤 7 的 1.5 ml 收集管中。

表 1 Buffer RLT 使用量及样品裂解方案

样品	数量	培养板	Buffer RLT	裂解方案
动物细胞	<5 x 10 ⁶	<6 cm	350 µl	加入 Buffer RLT 后涡旋
	≤1 x 10 ⁷	6-10 cm	600 µl	振荡 (≤1 x 10 ⁵ 细胞)， 或使用 QIAshredder， TissueRuptor，针筒
动物组织	<20 mg	—	350 µl*	组织破碎仪 TissueLyser
	≤30 mg	—	600 µl	LT；TissueLyser II； TissueRuptor，或研磨后 用 QIAshredder 处理， 或针筒

*如果样品是 RNAlater 中保存的组织或难裂解的组织，需使用 600 µl Buffer RLT

第二部分

柱上 DNA 酶消化

实验前注意事项：

- 如果是第一次使用无 RNA 酶 DNA 酶套装（RNase-Free DNase Set），请使用一个无 RNA 酶的注射器在 DNA 酶 I（DNase I）管中加入 550 µl 无 RNA 酶的水以配成储存液。颠倒试管轻轻混匀，勿震荡。
- 如果要长期保存 DNA 酶 I 储存液，请按每次使用量分装并保存于 -20℃，最多可保存 9 个月。解冻的储存液可在 2–8℃ 保存最多 6 个星期。请避免反复冻融。

1. 在 RNeasy 吸附柱中加入 350 µl Buffer RW1，关上吸附柱盖子，并以 ≥8000 x g (≥10,000 rpm) 转速离心 15 s。弃上清。
2. 在 70 µl Buffer RDD 中加入 10 µl DNase I 储存液，颠倒试管轻轻混匀。瞬时离心。
3. 将步骤 2 中的 DNase I 混合液（80 µl）直接加入 RNeasy 吸附柱的膜上，置于 20–30℃ 环境孵育 15 min。
4. 在吸附柱中加入 350 µl Buffer RW1，关上吸附柱盖子，并以 ≥8000 x g (≥10,000 rpm) 转速离心 15 s。弃上清。从第一部分的步骤 5 开始继续后面的流程，或从下面的“RNA 去杂质”步骤 4 开始继续。

RNA 去杂质

实验前注意事项：

■ 在 Buffer RPE 中加入 4 倍体积的乙醇（96-100%）。

1. 用无 RNA 酶的水将样品体积调整至 100 μ l。加入 350 μ l Buffer RLT，混合均匀。
2. 在稀释的 RNA 中加入 250 μ l 乙醇（96-100%），吹打混匀。勿离心，直接进行下面的步骤 3。
3. 将样品（700 μ l）转移到已套上 2 ml 收集管的 RNeasy 吸附柱，关上吸附柱盖，以 $\geq 8000 \times g$ （ $\geq 10,000$ rpm）转速离心 15 s。弃上清。
可选：如果需要进行柱上 DNA 酶消化，请在这步后按上面“柱上 DNA 酶消化”流程继续。
4. 在吸附柱中加入 500 μ l Buffer RPE，关上吸附柱盖，以 $\geq 8000 \times g$ （ $\geq 10,000$ rpm）转速离心 15 s。弃上清。
5. 在吸附柱中加入 500 μ l Buffer RPE，关上吸附柱盖，以 $\geq 8000 \times g$ （ $\geq 10,000$ rpm）转速离心 2 min。弃上清。
可选：把吸附柱转移到一个新的 2 ml 收集管（试剂盒内提供）中，关上吸附柱盖，以最大离心力离心 1 min。
6. 将吸附柱转移到一个新的 1.5 ml 收集管（试剂盒内提供）中，在吸附柱中央膜上直接加入 30-50 μ l 无 RNA 酶的水。关上吸附柱盖，以 $\geq 8000 \times g$ （ $\geq 10,000$ rpm）转速离心 1 min 以洗脱 RNA。
7. 如果预期 RNA 产量 $> 30 \mu$ g，用 30-50 μ l 无 RNA 酶的水再洗脱一次；若希望获得高浓度的 RNA，可用步骤 6 中洗脱产物重复洗脱。所有洗脱产物都可保存在步骤 6 的 1.5 ml 收集管中。