

## RNA 提取试剂盒

### 【产品介绍】

本试剂盒是用于提取培养细胞及动物组织、植物组织（植物幼嫩的叶、茎等）等 RNA 的广谱型小量纯化试剂盒。试剂盒采用了独特的细胞裂解系统，无需苯酚氯仿抽提等步骤，简单快捷。组织或细胞通过匀浆裂解或液氮研磨后在裂解液中释放核酸，裂解液分别经过 gDNA Eraser Spin Column(去除基因组 DNA)以及 RNA Spin Column(结合 RNA)，从而达到提取高质量 RNA 的目的。

本试剂盒具有高效、快速、方便之特点，组织或细胞裂解后，提取操作仅需 20 分钟便可完成。利用该试剂盒提取的 RNA 纯度高，基本不含蛋白质及基因组 DNA 污染。使用本试剂盒可从  $1.0E+05 \sim 1.0E+07$  培养细胞、5 ~ 40 mg 动物组织或 50-100mg 植物组织中纯化得到多至数十微克的高纯度 RNA。提取得到的 RNA 可以直接用于 Northern 杂交、斑点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RNA 分解酶的保护分析、RT-PCR、Real time RT-PCR、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

### 【产品组成】

名称	规格	温度
Buffer RL	32 ml	室温
Buffer RWD	28 ml	室温
Buffer RWC	30 ml	室温
RNase Free dH <sub>2</sub> O	15 ml	室温
gDNA Eraser Spin Column	50 支	室温
RNA Spin Column	50 套	室温
Collection Tube ( 2 ml )	50 支	室温
RNase Free Collection Tube (1.5ml)	50 支	室温
说明书	一份	

**注：**含有强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即到医院进行处理；首次使用前，向 Buffer RWC 中添加 70 ml 的 100%乙醇。

### 【试剂盒之外所需准备试剂】

无水乙醇；70%乙醇(0.1% DEPC 处理水配制)；PBS

**【试剂使用前的注意事项】**

1. Buffer RL 若出现沉淀，请于 60°C 加热溶解，待恢复至室温后使用。
2. 操作前请在 Buffer RL 中加入 50×DTT Solution 至终浓度为 2%，即每 1 ml 的 Buffer RL 中加入 20ul 的 50×DTT Solution。裂解 Buffer 最好现用现配。加入 50×DTT Solution 的 Buffer RL 可在室温放置 1 个月。
3. Buffer RWC 在首次使用前，请添加 70 ml 的 100%乙醇，混合均匀。
4. gDNA Eraser Spin Column 以及 RNA Spin Column 的最大容积为 600 μl，使用时如果液体的体积超出最大容积，请分批加入。
5. 预防 RNase 污染的注意事项：RNA 制备的关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用 RNA 操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。
6. 以下实验操作，如无特殊说明，均在室温进行。

**Table 1. 不同组织的最佳起始量和裂解 Buffer RL 使用量**

样品数量	裂解 Buffer RL 推荐用量
贴壁培养细胞(培养皿直径<6cm)	350ul
贴壁培养细胞(培养皿直径 6-10cm)	600ul
<5×10 <sup>6</sup> 的悬浮培养细胞	350ul
5×10 <sup>6</sup> ~1×10 <sup>7</sup> 悬浮培养细胞	600ul
5~20 mg 普通动物组织 (脑、肝脏等)	350ul
20~40 mg 普通动物组织 (脑、肝脏等)	600ul
5~20 mg 特殊组织(肺、肾脏、脾等)	350ul
20~40 mg 特殊组织 (肺、肾脏、脾等)	600ul
50~100 mg 植物组织 (叶片、茎)	500ul

**【操作方法】**

动物培养细胞的 RNA 提取

**一、细胞的裂解****悬浮培养的动物细胞裂解：**

1. 悬浮培养细胞连同培养液一起倒入离心管中，5000g，离心 2 分钟，弃上清。
2. 使用 1×PBS 清洗一次，5000g，离心 2 分钟，弃上清；向收集的细胞中加入适当量(Table 1 中推荐的使用量)的裂解 BufferRL。
3. 使用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。

**贴壁培养细胞的裂解：**

1. 吸去培养液，使用 1×PBS 清洗一次。
2. 向培养细胞中加入适当量的裂解 Buffer RL,水平放置片刻，使裂解液均匀分布于细胞表面并裂解细胞，然后使用移液枪吹打细胞使其脱落。
3. 将内含细胞的裂解液转移至离心管中，用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。

**继上述各自步骤 3**

4. 裂解液室温静置 2 分钟。
5. 小心吸取裂解液到新的 1.5mlRNase Free Tube 中。

注：对于基因组含量较多的材料或者材料起始量较大时，可以直接按步骤 8 进行(否则 DNA 含量过高可能造成 gDNA Eraser Spin Column 堵塞)，如基因组含量较低或材料起始量较少时，可以按步骤 4-7 进行。

6. 将 gDNA Eraser Spin Column 安放到 2ml 的 Collection Tube 上。
7. 将裂解液转移入到 gDNA Eraser Spin Column 中。
8. 12000rpm; 离心 1 分钟。
9. 弃 gDNA Eraser Spin Column(进行基因组 DNA 提取时请保留)。保留 2 ml Tube 中的滤液。
10. 向上述中加入与液体等体积的 70%乙醇(此时可能会出现沉淀)，使用移液枪将溶液混合均匀。
11. 立即将混合液（舍沉淀）全部转入到 RNA Spin Column(含 2 ml Collection Tube)中。(如果混合液的体积大于 600ul，请分批加入，每次加入的体积不要大于 600ul)
12. 12000rpm，离心 1 分钟，弃滤液。将 RNA Spin Column 放回到 2 ml Collection Tube 中。
13. 将 500ul 的 Buffer RWD 加入至 RNA Spin Column 中，12000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。
14. 将 600ul 的 Buffer RWC 加入至 RNA Spin Column 中，12000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。注：请确认 Buffer RWC 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。请沿 RNA Spin Column 管壁四周加入 Buffer RWC，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。
15. 重复步骤 14
16. 将 RNA Spin Column 重新安置于 2ml Collection Tube 上，12000 rpm 离心 2 分钟。
17. 将 RNA Spin Column 安置于 1.5ml 的 RNase Free Collection Tube(试剂盒提供)上，在 RNA Spin Column 膜中央处加入 50-200ul 的 RNase Free dH<sub>2</sub>O 或 0.1% DEPC 处理水，室温静置 5 分钟。
18. 12000rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。