



RNApure Tissue&Cell Kit

动物组织/细胞RNA提取试剂盒

目录号：CW0584S（50 preps）

保存条件：室温（15-30℃）

产品内容

Component	CW0584S 50 preps
Buffer RL	35 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	11 ml
RNase-Free Water	10 ml
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	50

产品简介

本试剂盒将高效的异硫氰酸胍裂解技术与硅基质膜纯化技术相结合，可从动物细胞及组织中高效提取总RNA。起始样本一般最多30 mg组织或1 x 10⁷细胞。本试剂盒还可回收未完全纯化的RNA、体外转录和酶促反应后得到的RNA。用本试剂盒可提取纯化分子量大于200碱基的高品质RNA，几乎无DNA残留。如果要进行对微量DNA非常敏感的RNA实验，残留的DNA可利用无RNase的DNase I在柱上进行消化去除。提取的RNA可用于RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot等下游实验。

自备试剂：β-巯基乙醇、无水乙醇（新开封或提取RNA专用）。

实验前准备及重要注意事项

1. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180℃高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无RNase的水。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
2. 提取的样品避免反复冻融，否则影响RNA提取的量和质量。
3. 使用前请检查Buffer RL是否出现结晶或者沉淀，可置于56℃加热重新溶液。Buffer RL在使用前请加入β-巯基乙醇，至终浓度为1%。如1ml Buffer RL加10μl β-巯基乙醇。加入β-巯基乙醇的Buffer RL室温可保存1个月。
4. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在Buffer RW2中加入无水乙醇。
5. 所有离心步骤如无特殊说明均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。
6. 若下游实验对DNA非常敏感，建议用不含RNase的DNase I（货号：CW2090S）对RNA进行处理。

操作步骤

1. 样品处理

1a 组织：将组织在液氮中磨碎。每**20-30 mg**组织加**600 μ l Buffer RL**（**使用前检查是否加入 β -巯基乙醇**），组织样本少于**20 mg**加**350 μ l Buffer RL**。样品体积不超过Buffer RL体积的十分之一。

1b 单层培养细胞：将细胞在培养瓶中直接裂解或处理成细胞悬液，离心得到细胞沉淀，弃上清，每**6-10 cm^2** 培养面积加入**600 μ l Buffer RL**，小于**6 cm^2** 加入**350 μ l Buffer RL**，反复吹打几次，使其充分裂解。

1c 细胞悬液：12,000 rpm（ $\sim 13,400\times g$ ）离心1分钟弃上清，得到细胞沉淀。每 **5×10^6 - 1×10^7** 细胞加入**600 μ l Buffer RL**，少于 **5×10^6** 细胞加入**350 μ l Buffer RL**，反复吹打几次，使其充分裂解。

注意：1）尽量除尽细胞培养基，细胞培养基可能抑制细胞的裂解影响RNA产量。

2）尽量使细胞充分悬浮并充分裂解，否则影响RNA产量。

2. 样品充分裂解后，室温放置5分钟，使蛋白核酸复合物完全分离。

3. 12,000rpm离心2-5 min，取上清进行下步操作。

4. 加入**1倍体积（600 μ l或350 μ l）的70%乙醇（无RNase水配制）**，混匀。

注意：加入乙醇后可能会产生沉淀，不会影响后续实验。

5. 将步骤4所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RM）中，若一次不能将全部溶液加入吸附柱中，请分两次转入，12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

注意：吸附柱的最大载量为100 μ g不要超载，否则会影响RNA的产量和纯度。

6. 向吸附柱中加入**700 μ l Buffer RW1**，12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

可选步骤：如果要进行对微量DNA非常敏感的RNA实验，则用以下步骤替代步骤6。

1) 向吸附柱中加入**350 μ l Buffer RW1**，12,000 rpm离心15秒，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。

2) 配制DNase I 混合液：取**52 μ l RNase-Free Water**，向其中加入**8 μ l 10 \times Reaction Buffer**和**20 μ l DNase I**（1 U/ μ l），混匀，配制成终体积为**80 μ l**的反应液。

注意：以上体系为按照我公司产品DNase I（CW2090S）反应体系进行配置，应用其他公司产品请参考相应说明书。

- 3) 向吸附柱中直接加入80 μl 配制好的DNase I 反应液，20-30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15分钟。
- 4) 向吸附柱中加入350 μl Buffer RW1, 12,000 rpm离心15秒，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。
7. 向吸附柱中加入**500 μl Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇)**，12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
8. 重复步骤7。
9. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。
注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。
10. 将吸附柱置于一个新的无RNase离心管中，向吸附柱的中间部位悬空加入30-50 μl RNase-Free Water，室温放置1分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集RNA溶液，-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存RNA，防止降解。
注意：1) RNase-Free Water体积不应小于30 μl ，体积过小影响回收率。
2) 如果要提高RNA的产量，可用30-50 μl 新的RNase-Free Water重复步骤10。
3) 如果要提高RNA浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤10。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途