

动物组织/培养细胞总 RNA 试剂盒说明书

产品组成

动物组织/培养细胞总 RNA 试剂盒	5 次样品	50 次制备
Cat. No.	5001005	5001050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
β -巯基乙醇	50 μ l	500 μ l
Buffer RLT	4 ml	32 ml
Buffer WA（浓缩液）	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR（浓缩液）	1.5 ml	10 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml \times 3
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

产品储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品不涉及酚氯仿的使用，适合从 ≤ 30 mg 组织/ $\leq 1 \times 10^7$ 培养细胞中分离纯化总 RNA。组织/培养细胞经裂解液溶解后释放 RNA，补加乙醇后加入纯化柱，RNA 结合在纯化柱上，溶解的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去。RNA 经两种洗液洗涤后，用 RNase-free Water 洗脱，即可用于 RT-PCR，Northern blot，Dot blot，mRNA 分离等各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇和 70%乙醇。
2. RNase-free 1.5 ml 离心管
3. 移液器及移液器吸头（**必须**选用 RNase-free 的移液器吸头，推荐使用含有滤芯的 DNase-free & RNase-free 吸头）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 旋涡振荡器
7. 无 RNA 酶使用的实验室

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 每 1 ml Buffer RLT 中加入 10 μ l β -巯基乙醇，混合均匀。加入 β -巯基乙醇的 Buffer RLT 一个月内使用不影响实验结果。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
4. 因唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在 RNA 提取的全过程中都戴乳胶手套和口罩。

动物组织操作步骤：

1. 在研钵中加入约 200~400 mg 切成碎屑的动物组织，加入液氮，将组织研磨至粉末状，再用液氮预冷的 1.5 ml 离心管称取 20~30 mg 研磨成粉末状的组织。

* 研磨组织时应及时补加液氮，避免组织融化，以免内源性的 RNA 酶恢复活性而降解 RNA。

* 勿使用超过 30 mg 组织，否则可能导致过滤柱堵塞，并使纯化的 RNA 中混有基因组 DNA 污染。

2. 加入 600 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇的 Buffer RLT，旋涡振荡直至组织全部溶解，溶液呈半透明状，13000 rpm 离心 2 分钟。

* Buffer RLT 具腐蚀性，请戴防护用品进行操作。

3. 将离心上清液全部倒入过滤柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 勿省略本步骤，否则可能导致后续的操作步骤中堵塞纯化柱。

* 如果溶解物不能全部滤过过滤柱，说明组织中核酸含量过高。此时应吸取 300 μ l 滤液转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，再加 300 μ l 70%乙醇到 1.5 ml 离心管中并用吸头吸注 6~8 次混合均匀，然后将全部混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。过滤柱及残余的滤液则丢弃不用，然后直接进入步骤 6 的操作。

4. 弃过滤柱，向滤液中加入 600 μ l 70%乙醇并直接用吸头吸注 6~8 次混合均匀，吸取 600 μ l 混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 加入 70%乙醇混合后如果有沉淀产生，请将沉淀一起加入到核酸纯化柱中。

5. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，吸取剩余的混合液加入到核酸纯化柱中，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

6. 弃 2 ml 离心管中的滤液，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，在核酸纯化柱中加入 600 μ l Buffer WBR，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 RT-PCR 效果。

9. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 50~100 μ l RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 -70℃ 以下备用。

* 即使电泳检测观察不到 DNA 条带，也不应认为纯化的 RNA 中不含基因组 DNA 污染，如需要彻底除去 DNA，请用 DNase I 消化残留的 DNA。

培养细胞操作步骤：

1. 在 1.5 ml 离心管中收集 $\leq 1 \times 10^7$ 培养细胞，用手指轻弹管壁，使细胞分散开来。

* 细胞收集方法：

- 悬浮培养的细胞：300×g 离心 5 分钟收集约 1×10^7 培养细胞，弃上清液。
- 贴壁培养的细胞：弃培养上清，用胰酶消化并悬浮细胞，300×g 离心 5 分钟收集约 1×10^7 培养细胞，弃胰酶上清液。
- 细胞培养板中单孔培养的细胞（如果单孔细胞数 $\leq 1 \times 10^5$ 时，请选用微量细胞总 RNA 试剂盒：Cat. No.: 5004050）：弃培养上清，直接加入 600 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇的 Buffer RLT，并用吸头来回吸注数次细胞使细胞溶解，直接进入步骤 3 操作。

2. 加入 600 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇的 Buffer RLT，旋涡振荡直至细胞全部溶解，溶液呈透明状。

* 勿使用过多的细胞，否则可能堵塞过滤柱并导致最后纯化的 RNA 基因组 DNA 污染严重。

3. 将细胞溶解物全部转移到过滤柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 2 分钟。

* 勿省略本步骤，否则可能导致后续的操作步骤中堵塞纯化柱。

* 如果此步骤有液体过滤不尽，则说明使用了过多的细胞。在步骤 4 可加入与滤液等体积的 70%乙醇继续操作，其他步骤不变。

4. 弃过滤柱，向滤液中加入 600 μ l 70%乙醇并用吸头吸注 6~8 次混合均匀，吸取 600 μ l 混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

5. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，吸取剩余的混合液加入到核酸纯化柱中，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

6. 弃 2 ml 离心管中的滤液，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，在核酸纯化柱中加入 600 μ l Buffer WBR，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 RT-PCR 效果。

9. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 50~100 μ l RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 -70°C 以下备用。

* 即使电泳检测观察不到 DNA 条带，也不代表纯化的 RNA 中不含 DNA 的污染，如需要彻底除去 DNA，请用 DNase I 消化残留的 DNA。