

微量动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

微量动物组织总 RNA 提取试剂盒	5 次制备	50 次制备
Cat. No.	5100005	5100050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 离心管	5 个	50 个
研磨棒	5 个	50 个
蛋白酶 K 贮存液	60 μ l	0.6 ml
DNase I	28 μ l	270 μ l
Buffer RDD	250 μ l	2.5 ml
β -巯基乙醇	50 μ l	500 μ l
Buffer RL	2 ml	20 ml
超纯水	4 ml	40 ml
Buffer WAR	5 ml	40 ml
Buffer WBR（浓缩液）	2 ml	12 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml $\times$ 3
说明书	1 份	1 份

产品储存

1. 蛋白酶 K 贮存液和 DNase I 请于 -20℃ 储存。
2. 其他试剂与物品如果储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上。

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

本试剂盒可从 10~20 mg 动物组织中快速提取总 RNA，可同时处理大量不同样品。提取的总 RNA 纯度高，没有基因组 DNA、蛋白和其它杂质的污染，可用于 RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. RNase-free 1.5 ml 离心管
3. 移液器及吸头（为避免 RNA 酶的污染，建议选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
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. 水浴锅和旋涡振荡器
7. 无 RNA 酶使用的实验室

使用前准备

1. 操作前在 Buffer RL 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，比如 1 ml Buffer RL 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配，加入 β -巯基乙醇的 Buffer RL 4℃可放置一个月。Buffer RL 在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
2. 第一次使用前应根据试剂瓶标签上的指示在 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。
3. 因为唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，所以 RNA 提取的全过程都需要戴乳胶手套和口罩。
4. 以下操作如非指明，均在室温下进行。

操作步骤：

1. 匀浆处理：

每 10~20 mg 组织加 300 μ l 已加入 β -巯基乙醇的 Buffer RL, 用研磨棒将组织彻底研磨；随后向匀浆液中加入 590 μ l 超纯水和 10 μ l 蛋白酶 K 贮存液，混匀后 56 $^{\circ}$ C 温育 10~20 分钟。

* 组织必须加入 Buffer RL 后方可研磨，否则会导致 RNA 降解。若组织较难彻底研磨，可选用电动或玻璃匀浆器。

* 组织量不要超过 20 mg，否则将导致 RNA 得率和质量下降。

2. 12,000 rpm 离心 2~5 分钟，吸取上清转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中。

3. 加入 450 μ l 无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），转移 700 μ l 得到的溶液和沉淀到核酸纯化柱中（核酸纯化柱放在 2 ml 离心管中），12,000 rpm 离心 1 分钟，弃掉 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱放回 2 ml 离心管中。

* 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。

4. 将步骤 3 中剩余的混合液转入核酸纯化柱中，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃掉 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱放回 2 ml 离心管中。

5. 向核酸纯化柱中加入 350 μ l Buffer WAR，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃滤液，将核酸纯化柱放回 2 ml 离心管中。

6. 取 5 μ l DNase I 放入新的 RNase-free 离心管中，加入 45 μ l Buffer RDD，吹打混匀，将混液全部加入核酸纯化柱中央，室温放置 15 分钟。

7. 向核酸纯化柱中加入 350 μ l Buffer WAR，12,000 rpm 离心 30 秒，弃滤液，将核酸纯化柱放回 2 ml 离心管中。

8. 向核酸纯化柱中加入 550 μ l Buffer WBR，室温静置 2 分钟，12,000 rpm 离心 30 秒，弃滤液，将核酸纯化柱放回 2 ml 离心管中。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

9. 重复步骤 8 一次。

10. 最高速 ($\geq 12,000$ rpm) 离心 2 分钟，弃 2 ml 离心管。

* 此步骤目的是将核酸纯化柱中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的 RT 等实验。

11. 将核酸纯化柱放入一个洁净的 RNase-free 1.5 ml 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 30~100 μ l RNase-free Water，室温放置 2 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟，得到 RNA 溶液。

* RNase-free Water 体积不应少于 30 μ l，体积过小会影响 RNA 的回收效率。RNA 请于 -70 $^{\circ}$ C 以下保存。