

快速总 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

快速总 RNA 提取试剂盒	5 次制备	50 次制备
Cat. No.	5012005	5012050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 离心管	5 个	50 个
Buffer RLF	4 ml	30 ml
Buffer WN	3 ml	28 ml
Buffer WBR (浓缩液)	1.5 ml	12 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml×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°C），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

本产品采用最新的 RNA 柱纯化技术，可以从 $10^6\text{-}10^7$ 动物培养细胞或 15~50 mg 的动物组织中快速（15 分钟内）提取到高纯度总 RNA。特殊的裂解液 Buffer RLF 能高效地溶解生物样本，基因组 DNA、色素、蛋白质等杂质则被离心形成沉淀去除。纯化柱上吸附的 RNA 经 Buffer WN 和 Buffer WBR 洗涤后，用 RNase-free 水溶解，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
2. RNase-free 1.5 ml 离心管，可能需要研磨棒（Simgen Cat. No. D-050）
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、口罩及防护用品和纸巾
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°C。
2. 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。

操作步骤：

培养细胞请按 1a 操作；容易匀浆的动物组织（肝脏、脑等）请按 1b 操作；坚韧的动物组织（皮肤、结缔组织等）请按 1c 操作；细菌请按 1d 操作。

1a. 收集 $10^6\text{-}10^7$ 的细胞。对于悬浮培养的细胞， $300\times g$ 离心 5 分钟弃尽上清，轻弹离心管管壁使细胞沉淀分散开来，加入 $500 \mu\text{l}$ Buffer RLF，反复吹打或旋涡振荡直至细胞全部溶解。对于贴壁细胞或单孔培养的细胞，吸尽培养液后加入 $500 \mu\text{l}$ Buffer RLF，反复吹打直至细胞全部溶解。

1b. 称取 $15\text{~}50 \text{ mg}$ 动物组织，快速切成小颗粒后立即转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 $300 \mu\text{l}$ Buffer RLF，用研磨棒（Simgen Cat. No. D-050）研磨至无明显颗粒，再补加 $200 \mu\text{l}$ Buffer RLF，旋涡振荡 15 秒混匀。

* 胰脏、肝脏等核酸含量高的组织用量不要超过 25 mg ，否则提取的总 RNA 中可能会残留基因组 DNA。

1c. 在研钵中加入 $25\text{~}50 \text{ mg}$ 动物组织，加入液氮，将组织研磨至粉末状，立即加入 $500 \mu\text{l}$ Buffer RLF，待溶液重新液化后再研磨数次，将匀浆液转移至 1.5 ml 离心管中，若匀浆液不足 $500 \mu\text{l}$ ，可补加 Buffer RLF 至 $500 \mu\text{l}$ ，再旋涡振荡混匀。也可在加入 Buffer RLF 的情况下用匀浆器或研磨珠研磨组织。

* 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。

1d. 用 1.5 ml 离心管收集 $10^8\text{-}10^9$ 的细菌培养物，加入 $50 \mu\text{l}$ DEPC 处理水重悬沉淀，再加入 $50 \mu\text{l}$ 3 mg/ml DEPC 处理水配制的溶菌酶溶液，旋涡振荡混匀， 37°C 孵育 10-30 分钟。加入 $500 \mu\text{l}$ Buffer RLF，反复吹打或旋涡振荡直至细菌全部溶解。

* 1.0×10^9 细菌相当于 $1 \text{ ml OD}_{600}=1$ 的细菌培养物中的细菌数量。

2. 最高速离心 2 分钟。在一个洁净的 RNase-free 1.5 ml 离心管中加入 $250 \mu\text{l}$ 无水乙醇备用。

3. 将步骤 2 中的上清液全部倒入装有无水乙醇的 RNase-free 1.5 ml 离心管中，盖上管盖，用力摇晃离心管混合均匀。

* 如果离心上清顶部有漂浮物（一般为脂类物质），请改用移液器吸取并转移上清到装有无水乙醇的 RNase-free 1.5 ml 离心管中，不要带入漂浮物和沉淀。

4. 将混合液全部加入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 离心管中），盖上管盖， 12000 rpm 离心 30 秒。

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。在核酸纯化柱中加入 $500 \mu\text{l}$ Buffer WN，盖上管盖， 12000 rpm 离心 30 秒。

6. 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。在核酸纯化柱中加入 $750 \mu\text{l}$ Buffer WBR，盖上管盖， 12000 rpm 离心 30 秒。

* 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。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

7. 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。

* 此步骤高速空离是为了去尽残留的乙醇，请勿省略，否则可能因所纯化的核酸中残留有乙醇而影响后续的实验效果。

8. 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 $50\text{-}100 \mu\text{l}$ 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。

9. 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。

* 即使电泳检测不到基因组 DNA 条带，也不代表所获得的 RNA 中没有残留的基因组 DNA。如果要避免残留的 DNA 对后续 RT-PCR 结果的影响，推荐使用含 DNA 清除步骤的反转录试剂盒（Simgen Cat. No. 7306100/7316100）。