

操作手册

RNA 小量提取试剂盒

Catalog No. TR154-50 (50 次反应)

TR154-200 (200 次反应)

Highlights

- 适用于从细胞，组织，酵母菌，植物或者细菌中提取到总 RNA（含 microRNA）。
- 提取到的 RNA 不含 DNA,并可应用于 Q-PCR，高通量测序等实验。
- 此产品仅供科研使用。

Ver.1.0.9

产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次	200 次
RNA 裂解液	室温	50 ml	2 X 100 ml
RNA 预洗液	室温	25 ml	100 ml
RNA 洗涤液	室温	24 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	2 X 48 ml
RNase-free H ₂ O	室温	6 ml	30 ml
DNase I	-20°C	250U X 1 管	250U X 4 管
DNA 消化液	室温	4 ml	16 ml
3 号柱 G (绿色)	室温	50 个	200 个
3 号柱 Y (黄色)	室温	50 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	200 个

特性:

1. 样品来源: 细胞, 组织, 酵母, 植物或者细菌, 兼容核酸保护剂。
2. 样品范围: 最多 10^7 细胞或50mg的组织。
3. RNA纯度: 高质量的RNA可应用于高通量测序等敏感的下游实验。
4. RNA回收率: 可从30 μ l洗脱体积中回收到100 μ g的RNA。

试剂制备

RNA 洗涤液 在使用之前一定要配好, 添加好乙醇后在试剂瓶上做好标记!!!
需要添加 96ml100%的乙醇 (或 104ml95%乙醇) 到 24ml 的 **RNA 洗涤液** 中
需要添加 192 ml 100% ethanol (208 ml 95% ethanol) 到 48ml 的 **RNA 洗涤液** 中
试用装已经添加好无水乙醇, 无需额外添加。

溶解冻干粉状态的DNase I需要按照管子上的量添加 RNase-free H₂O

一般250U的DNase I 需要添加275 μ l的RNase-free H₂O

操作步骤:

整个操作步骤是由3个步骤组成：(I) 样品裂解匀浆 (II) 样品清理 (III) 样品纯化.

所有步骤均在室温下操作 (20-30℃)

(I) 样品裂解匀浆

RNA裂解液用量	300µl	600µl
细胞	$<5 \times 10^6$	$>5 \times 10^6$
组织	$<20\text{mg}$	$\leq 50\text{mg}$

贴壁细胞

去除液体培养基后，直接往培养板中加入RNA裂解液溶解细胞，并用移液枪轻轻吹打混匀。依据细胞的数量来决定所需的RNA裂解液量。

悬浮细胞

离心沉淀细胞($\leq 500 \times g$)，完全去除上清后用RNA裂解液重悬细胞沉淀。可短暂涡旋振荡。

其他组织:

其他难裂解的组织，酵母，植物匀浆需要配合蛋白酶K和裂解珠（选配）。

DNA/RNA保护剂中的组织

将添加了DNA/RNA保护剂的匀浆样品放到室温下，添加1体积的RNA裂解液，混匀，然后进行样品纯化步骤。

(II) 样品清理与基因组DNA去除：此步骤主要是针对动植物组织和细胞，对于样品量很低(细胞数 $\leq 10^5$)或无细胞的液体样本则无需此步。

1. 将上述匀浆裂解物在离心力 $\geq 10,000 \times g$ 下离心1分钟。
2. 将上清移至3号柱Y,柱子套在一个收集管内，1.5ml离心管中，在离心力 $\geq 10,000 \times g$ 下离心1分钟去除DNA.

保存滤出液用于RNA纯化。

(III) 样品纯化：以下离心力均在10,000-16,000 x g范围内进行。

1. 加入等体积(95-100%)的无水乙醇到上一步含有RNA裂解液的上清中混匀。
2. 将上述混合物放入套在收集管上的3号柱G里，离心1分钟。去除滤出液。
3. 柱上DNase I消化处理（可选）

此步骤主要是为了去除痕量的DNA. a) 添加400μl的RNA洗涤液到3号柱G里，离心1分钟。去除滤出液。

b)对于每一次的样品处理需要制备80μl的DNase I反应液。配比为 DNase I 5μl DNA消化液 75μl

c)直接添加80μl的DNase I反应液到3号柱G上，在室温下（20-30℃）孵育15分钟。

4. 添加400μl的RNA预洗液到3号柱G里，离心1分钟。去除滤出液。
5. 添加700μl的RNA洗涤液到3号柱G里，离心1分钟。去除滤出液。
6. 添加400μl的RNA洗涤液到3号柱G里，离心2分钟以去除残留的乙醇，以免抑制下游反应。
7. 取出3号柱G，放入一个无RNA酶的离心管中，在吸附膜的中间部位加100μl RNase-free water, 室温放置2分钟，离心1分钟洗脱RNA。