



# Tissue/Cell Total RNA Extraction Kit

## RP301

### 产品概述

Product Overview

本试剂盒采用柱式法，搭配强力裂解液 Buffer HL，可从多种动物组织、培养细胞及植物样本(包括富含多糖多酚类样本)中快速提取总RNA（针对骨组织、脂肪组织和血液样本，请使用相应专用试剂盒）。

独特的裂解液配方和纯化技术，能迅速裂解细胞并灭活 RNA 酶，可有效去除多糖多酚对 RNA 提取的影响，提取过程无需苯酚、氯仿和  $\beta$ -巯基乙醇等有毒试剂。含有 gDNA-Filter Columns 去除基因组 DNA，经乙醇调节后，RNA 吸附于硅基质膜上，使得提取的总 RNA 纯度高、gDNA 残留少、无蛋白质和其它杂质污染，可直接用于 Real Time RT-PCR、RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译和分子克隆等多种下游实验。

### 产品组成

Product Composition

组 分	RP301 50 rxns
Buffer HL	40 mL
Buffer RW1	40 mL
Buffer RW2	12 mL
Proteinase K	550 $\mu$ L
RNase-free H <sub>2</sub> O	15 mL
gDNA-Filter Columns with Collection Tubes	50 pcs
Spin Columns RA with Collection Tubes	50 pcs
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 mL)	50 pcs

### 注意事项

Precautions

1. 建议优先选用新鲜或幼嫩组织进行提取；若为冻存样品，应避免反复冻融，避免影响 RNA 的得率和质量；
2. 样本量不得超过建议最大起始量，以免裂解不充分或堵塞 Spin Columns RA，影响 RNA 的纯度和产量；
3. 可去除体系中大部分的 DNA 污染，纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase I 处理即可用于下游实验操作；
4. 实验全程使用 RNase-free 的离心管与吸头，防止操作环境、容器、耗材及试剂受 RNase 污染；
5. Spin Columns RA 的最大容积为 700  $\mu$ L，若液体体积超过该容量，请分次上柱离心；
6. Buffer RW2 首次使用前，请务必按试剂瓶标签说明加入无水乙醇，并做好标记；
7. Buffer HL 低温下可能出现沉淀，水浴加热至完全溶解后使用。

## ◆ 实验前准备

- 1: 自备: 无水乙醇、RNase-free 1.5 mL 离心管、RNase-free 枪头。
- 2: 按照瓶身说明给 Buffer RW2 加入无水乙醇, 并做好标记。

## ◆ 样本处理

注: 样本充分裂解是获得理想 RNA 得率与纯度的关键。样本量过大会导致裂解不充分、纯化柱堵塞等问题, 从而降低RNA的最终得率与纯度。

## a: 贴壁培养细胞

1. 吸出培养液, 用  $1 \times$  PBS 清洗细胞一次;
2. 吸出 PBS 洗液, 向常规 6 孔板每孔或直径 3.5 cm 平皿(约  $10 \text{ cm}^2$  培养面积)的细胞加入  $600 \mu\text{L}$  Buffer HL 和  $10 \mu\text{L}$  Proteinase K, 轻摇培养皿, 确保 Buffer HL 溶液均匀分布于细胞表面;

注: 对于贴壁牢固的培养细胞可用细胞刮勺剥离细胞。

3. 使用移液器反复吹打使细胞脱落, 然后将内含细胞的裂解液转移至离心管中, 再用移液器吹打直至裂解液中无明显沉淀(溶液清亮)。

## b: 悬浮培养细胞

每收集  $1 \times 10^7$  个悬浮细胞至离心管,  $8,000 \text{ g}$  室温离心 2 min, 弃上清; 加入  $600 \mu\text{L}$  Buffer HL 和  $10 \mu\text{L}$  Proteinase K 至细胞沉淀中, 用移液器吹打直至裂解液清亮无明显沉淀。

c: 动物组织 (10 ~ 30 mg)、植物组织 (10 ~ 50 mg)、酵母 ( $\leq 3 \times 10^7$  个细胞) 样品

1. 将准确称量的样品加入至液氮预冷的研钵中, 用研杵研磨组织(研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮), 直至研磨成粉末状, 然后向粉末中加入  $600 \mu\text{L}$  Buffer HL 和  $10 \mu\text{L}$  Proteinase K 并混匀。(针对柔软易裂解的组织样本, 也可以使用匀浆器加入适量 Buffer HL 进行匀浆裂解。)
2. 将上述混合液转移至离心管中, 用移液器反复吹打充分混匀。

## d: 细菌

每收集  $\leq 2 \times 10^9$  的细菌至离心管,  $12,000 \text{ rpm}$  室温离心 2 min, 弃上清。加入  $600 \mu\text{L}$  Buffer HL 和  $10 \mu\text{L}$  Proteinase K, 用移液枪上下反复吸打直至菌体完全裂解。

## ◆ RNA 提取

1. 将上述裂解液(含样本)室温放置 5 min 后  $12,000 \text{ rpm}$  离心 2 min。
2. 取约  $500 \mu\text{L}$  上清加入 gDNA-Filter Columns 中,  $12,000 \text{ rpm}$  ( $\sim 13,400 \times \text{g}$ ) 离心 1 min, 保留滤液。

注: 枪头尽量不要触碰到沉淀底部, 以免吸到杂质。

3. 向上述滤液中缓慢加入 0.5 倍上清体积的无水乙醇(约  $250 \mu\text{L}$ ), 振荡混匀(此时可能会出现絮状沉淀), 得到的溶液和絮状沉淀一起移入 Spin Columns RA 中,  $12,000 \text{ rpm}$  ( $\sim 13,400 \times \text{g}$ ) 离心 30 sec, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。
4. 如果不进行 DNase I 消化, 向 Spin Columns RA 中加入  $700 \mu\text{L}$  Buffer RW1,  $12,000 \text{ rpm}$  ( $\sim 13,400 \times \text{g}$ ) 离心 30 s 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
5. DNase I 消化(可选): 若后续实验对 RNA 纯度要求比较严格, 可以选择性的进行 DNase I 消化。

注: DNase I 需自行购买, 具体型号参见选配试剂。(以 YoungGen, Cat#RM401 为例)

- 1) 向 Spin Columns RA 中加入  $350 \mu\text{L}$  Buffer RW1,  $12,000 \text{ rpm}$  ( $\sim 13,400 \times \text{g}$ ) 离心 30 s, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
- 2) DNase I 反应液的配制:

组 分	体 积 (μL)
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	to 100 μL
10 × Reaction Buffer	10 μL
DNase I, RNase-free (5 U/μL)	1 μL

- 3) 向 Spin Columns RA 中央加入 100 μL 的 DNase I 反应液，室温放置 15 min。
- 4) 向 Spin Columns RA 中加入 350 μL Buffer RW1，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. 向 Spin Columns RA 中加入 500 μL Buffer RW2 (使用前请先检查是否已加入乙醇)，室温静置 2 min，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 30-60 s，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
8. 重复步骤 6。
9. 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 min，倒掉废液。将 Spin Columns RA 置于室温放置 2 min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
10. 将 Spin Columns RA 转入一个新的 RNase-Free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 30-100 μL RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，室温放置 2 min，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 min，得到 RNA 溶液。

注：此步骤目的是将 Spin Columns RA 中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续实验。

注：洗脱缓冲液体积不应少于 30 μL，体积小影响回收效率。RNA 溶液请于-80℃保存。

可通过以下步骤都帮助提高 RNA 产物浓度：

RNase-free ddH<sub>2</sub>O 于 65℃预热；

滴加 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 后室温静置 5 min；

将第一次洗脱液重新加入吸附柱进行洗脱。

## 保存条件

Storage Conditions

室温运输。室温保存，15~30℃。保质期24个月。