



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 β -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 μ L
RNase-free H ₂ O	15 mL
gDNA-Filter Columns with Collection Tubes	50 pcs
Spin Columns RA with Collection Tubes	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，若后续实验对 RNA 纯度要求严格，可以选择性的进行 DNase I 消化；
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 μ 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。

操作流程

Operation Process

◆ 实验前准备

- 1: 自备: 无水乙醇、RNase-free 1.5 mL 离心管、RNase-free 枪头, DNase I (可选), lysozyme (细菌用)。
- 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 $1 \times \text{PBS}$ 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 cm^2 培养面积)的细胞加入 600 μL Buffer HL 和 10 μL 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 1×10^7 个悬浮细胞至离心管, 8,000 g 室温离心 2 min, 弃上清; 加入 600 μL Buffer HL 和 10 μL 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 μL Buffer HL 和 10 μL 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 rpm 室温离心 2 min, 弃上清。用 1mg/mL lysozyme 37°C 孵育 5min 后加入 600 μL Buffer HL 和 10 μL Proteinase K, 用移液枪上下反复吹打充分混匀。

◆ RNA 提取

1. 将上述裂解液(含样本)室温放置 5 min 后 12,000 rpm 离心 2 min。
2. 取约 500 μL 上清加入 gDNA-Filter Columns 中, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min, 保留滤液。
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 μL), 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 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 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 μL Buffer RW1, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 s 弃废液, 将吸附柱放回收集管中, 进行步骤 6。进行 DNase I 消化, 进行步骤 5。
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 μL Buffer RW1, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 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 ₂ 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。
7. 重复步骤 6。
8. 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。
9. 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 ddH₂O，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，体积过小影响回收效率。RNA 溶液请于-80℃保存。

可通过以下步骤帮助提高 RNA 产物浓度：

RNase-free ddH₂O 于 65℃预热；

滴加 RNase-free ddH₂O 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

Proteinase K -20℃ 保存，干冰运输，其他组分：室温运输，室温保存。保质期限24个月。