

## 动物组织/培养细胞总 RNA 试剂盒说明书

### 产品组成

动物组织/培养细胞总 RNA 试剂盒	5 次样品	50 次制备
Cat. No.	5001005	5001050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
β-巯基乙醇	50 μl	500 μl
Buffer RLT	4 ml	32 ml
Buffer WA (浓缩液)	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR (浓缩液)	1.5 ml	10 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

试剂盒如果储存于常温（0~30℃），可在三年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至三年以上。

### 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

本产品不涉及酚氯仿的使用，适合从≤30 mg 组织/≤1×10<sup>7</sup> 培养细胞中分离纯化总 RNA。组织/培养细胞经裂解液溶解后释放 RNA，补加乙醇后加入纯化柱，RNA 结合在纯化柱上，溶解的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去。RNA 经两种洗液洗涤后，用 RNase-free Water 洗脱，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. 无水乙醇和 70% 乙醇。
2. RNase-free 1.5 ml 离心管
3. 移液器及移液器吸头（必须选用 RNase-free 的移液器吸头，推荐使用含有滤芯的 DNase-free & RNase-free 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. 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℃。
2. 每 1 ml Buffer RLT 中加入 10 μl β-巯基乙醇，混合均匀。加入 β-巯基乙醇的 Buffer RLT 一个月内使用不影响实验结果。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 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。
4. 因唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在 RNA 提取的全过程中都戴乳胶手套和口罩。

## 动物组织操作步骤：

1. 在研钵中加入约200~400 mg切成碎屑的动物组织，加入液氮，将组织研磨至粉末状，再用液氮预冷的1.5 ml离心管称取20~30 mg研磨成粉末状的组织。

\* 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。

\* 勿使用超过30 mg组织，否则可能导致过滤柱堵塞，并使纯化的RNA中混有基因组DNA污染。

2. 加入600  $\mu$ l已经加入了 $\beta$ -巯基乙醇的Buffer RLT，旋涡振荡直至组织全部溶解，溶液呈半透明状，13000 rpm离心2分钟。

\* Buffer RLT具腐蚀性，请戴防护用品进行操作。

3. 将离心上清液全部倒入过滤柱中，盖上管盖，13000 rpm离心1分钟。

\* 勿省略本步骤，否则可能导致后续的操作步骤中堵塞纯化柱。

\* 如果溶解物不能全部滤过过滤柱，说明组织中核酸含量过高。此时应吸取300  $\mu$ l滤液转移到一个洁净的1.5 ml离心管中，再加300  $\mu$ l 70%乙醇到1.5 ml离心管中并用吸头吸注6~8次混合均匀，然后将全部混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm离心1分钟。过滤柱及残余的滤液则丢弃不用，然后直接进入步骤6的操作。

4. 弃过滤柱，向滤液中加入600  $\mu$ l 70%乙醇并直接用吸头吸注6~8次混合均匀，吸取600  $\mu$ l混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm离心1分钟。

\* 加入70%乙醇混合后如果有沉淀产生，请将沉淀一起加入到核酸纯化柱中。

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，吸取剩余的混合液加入到核酸纯化柱中，13000 rpm离心1分钟。

\* 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。

6. 弃2 ml离心管中的滤液，在核酸纯化柱中加入500  $\mu$ l Buffer WA，盖上管盖，13000 rpm离心1分钟。

\* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

7. 弃2 ml离心管中的滤液，在核酸纯化柱中加入600  $\mu$ l Buffer WBR，盖上管盖，13000 rpm离心1分钟。

\* 确认在Buffer WBR中已经加入无水乙醇。

8. 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。

\* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的RT-PCR效果。

9. 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50~100  $\mu$ l RNase-free Water，盖上管盖，室温静置1分钟，13000 rpm离心1分钟。

\* 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1.5 ml离心管管盖脱落而损伤离心机。

10. 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 $^{\circ}$ C备用。

\* 即使电泳检测观察不到DNA条带，也不应认为纯化的RNA中不含基因组DNA污染，如需要彻底除去DNA，请用DNase I消化残留的DNA。

## 培养细胞操作步骤：

1. 在1.5 ml离心管中收集 $\leq 1 \times 10^7$ 培养细胞，用手指轻弹管壁，使细胞分散开来。
  - \* 细胞收集方法：
    - a. 悬浮培养的细胞：300×g离心5分钟收集约 $1 \times 10^7$ 培养细胞，弃上清液。
    - b. 贴壁培养的细胞：弃培养上清，用胰酶消化并悬浮细胞，300×g离心5分钟收集约 $1 \times 10^7$ 培养细胞，弃胰酶上清液。
    - c. 细胞培养板中单孔培养的细胞（如果单孔细胞数 $\leq 1 \times 10^5$ 时，请选用微量细胞总 RNA 试剂盒：Cat. No.: 5001150）：弃培养上清，直接加入 600  $\mu$ l 已经加入了 $\beta$ -巯基乙醇的 Buffer RLT，并用吸头来回吸注数次细胞使细胞溶解，直接进入步骤 3 操作。
2. 加入600  $\mu$ l已经加入了 $\beta$ -巯基乙醇的Buffer RLT，旋涡振荡直至细胞全部溶解，溶液呈透明状。
  - \* 勿使用过多的细胞，否则可能堵塞过滤柱并导致最后纯化的RNA基因组DNA污染严重。
3. 将细胞溶解物全部转移到过滤柱中，盖上管盖，13000 rpm离心2分钟。
  - \* 勿省略本步骤，否则可能导致后续的操作步骤中堵塞纯化柱。
  - \* 如果此步骤有液体过滤不尽，则说明使用了过多的细胞。在步骤4可加入与滤液等体积的70%乙醇继续操作，其他步骤不变。
4. 弃过滤柱，向滤液中加入600  $\mu$ l 70%乙醇并用吸头吸注6~8次混合均匀，吸取600  $\mu$ l混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm离心1分钟。
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，吸取剩余的混合液加入到核酸纯化柱中，13000 rpm离心1分钟。
  - \* 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。
6. 弃2 ml离心管中的滤液，在核酸纯化柱中加入500  $\mu$ l Buffer WA，盖上管盖，13000 rpm离心1分钟。
  - \* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。
7. 弃2 ml离心管中的滤液，在核酸纯化柱中加入600  $\mu$ l Buffer WBR，盖上管盖，13000 rpm离心1分钟。
  - \* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。
8. 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。
  - \* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的RT-PCR效果。
9. 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50~100  $\mu$ 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。
10. 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℃备用。
  - \* 即使电泳检测观察不到DNA条带，也不代表纯化的RNA中不含DNA的污染，如需要彻底除去DNA，请用DNase I消化残留的DNA。