杭州新景生物试剂开发有限公司
地址：浙江省杭州市西湖科技经济园金蓬街 366 号 1 幢东 4F
邮编：310030　电话：0571-87381295　传真：0571-87381297

微量动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

微量动物组织总 RNA 提取试剂盒	5 次制备	50 次制备
Cat. No.	5100005	5100050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 离心管	5 个	50 个
研磨棒	5 个	50 个
蛋白酶 K 贮存液	60 µl	0.6 ml
DNase I	28 µl	270 µl
Buffer RDD	250 µl	2.5 ml
β-巯基乙醇	50 µl	500 µl
Buffer RL	2 ml	20 ml
超纯水	4 ml	40 ml
Buffer WAR	5 ml	40 ml
Buffer WBR（浓缩液）	2 ml	12 ml
RNase-Free Water	1.5 ml	2 ml×3
说明书	1 份	1 份

产品储存

1. 蛋白酶 K 贮存液、DNase Ⅰ和 Buffer RDD 请于 - 20℃储存。
2. 其他试剂与物品如果储存于室温（15~25℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上。

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

本试剂盒可从 10~20 mg 动物组织中快速提取总 RNA，可同时处理大量不同样品。提取的总 RNA 纯度高，没有基因组 DNA、蛋白和其它杂质的污染，可用于 RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

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
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. 水浴锅和旋涡震荡器
7. 无 RNA 酶使用的实验室

使用前准备

1. 操作前在 Buffer RL 中加入β-巯基乙醇至终浓度 1%，比如 1 ml Buffer RL 中加入 10 µl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 Buffer RL 4℃可放置一个月，Buffer RL 在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
2. 第一次使用前应在 Buffer WBR 中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
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。
4. 以下操作如非指明，均在室温下进行。

操作步骤：

1. 匀浆处理：

   每 10~20 mg 组织加 300 µl 已加入β-巯基乙醇 Buffer RL，用研磨棒将组织彻底研磨；随后向匀浆液中加入 590 µl 超纯水和 10 µl 蛋白酶 K 贮存液，混匀后 56℃处理 10~20 min。

   * 组织中必须加入 Buffer RL 后方可研磨，否则会导致 RNA 降解。如组织较难彻底研磨，可选用电动或玻璃匀浆器。

   * 组织量不要超过 20 mg，否则将导致 RNA 得率和质量下降。

2. **12,000 rpm 离心 2~5 min，吸取上清转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中。**
3. **加入 450 µl 无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），转移 700 µl 得到的溶液和沉淀到核酸纯化柱中（核酸纯化柱放在 2 ml 离心管中），12,000 rpm 离心 1 min，弃掉 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱放回 2 ml 离心管中。**

   * 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。

4. **将步骤 3 中剩余的混合液转入核酸纯化柱中，12,000 rpm 离心 1 min，弃掉 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱放回 2 ml 离心管中。**
5. **向核酸纯化柱中加入 350 µl Buffer WAR，12,000 rpm 离心 1min，弃滤液，将核酸纯化柱放回 2 ml 离心管中。**
6. **取 5 µl DNase I 放入新的 RNase-Free 离心管中，加入 45 µl Buffer RDD，轻柔混匀，将混液全部加入核酸纯化柱中央，室温放置 15 min。**
7. **向核酸纯化柱中加入 350 µl Buffer WAR，12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液，将核酸纯化柱放回 2 ml 离心管中。**
8. **向核酸纯化柱中加入 550 µl Buffer WBR，室温静置 2 min，12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液，将核酸纯化柱放回 2 ml 离心管中。**

   * 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

9. **重复步骤 8 一次。**
10. **最高速（≥12,000 rpm）离心 2 min，弃 2 ml 离心管。**

    * 此步骤目的是将核酸纯化柱中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的 RT 等实验。

11. **将核酸纯化柱放入一个洁净的 RNase-free 1.5 ml 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 30~100 µl RNase-Free Water，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液。**

    * 洗脱缓冲液体积不应少于 30 µl，体积过小影响 RNA 的回收效率。RNA 溶液请于 - 80℃保存。