

## AR 细胞/组织 RNA 柱式提取试剂盒 (50rxns)

### AR Tissue/Cell Total RNA Isolation Kit (50rxns)

RM0051

#### 产品信息

| 组分名称                          | 保存    | 规格   |
|-------------------------------|-------|------|
| 裂解液 RL                        | 4°C避光 | 50mL |
| 去蛋白液 RE                       | 室温    | 45mL |
| 漂洗液 RW                        | 室温    | 10mL |
| RNase-free ddH <sub>2</sub> O | 室温    | 10mL |
| RNase-free 吸附柱 RA             | 室温    | 50 个 |
| 收集管(2mL)                      | 室温    | 50 个 |
| RNase-free 离心管 (1.5 ml)       | 室温    | 50 个 |

#### 保存条件

本产品收到后按照上面指示温度存放各成份, 储存 12 个月不影响使用效果。裂解液 RL 可以常温运输, 收到后 4°C避光保存。

#### 产品介绍

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活 RNA 酶, 然后总 RNA 在高盐状态下选择吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗-离心的步骤, 去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase free H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

#### 产品特点

- 基因组残留少: 一步去除 gDNA 污染
- RNA 纯度高: 获得的 RNA 可直接用于下游纯度要求高的实验
- 适用性广: 兼容各种细胞、组织样本

#### 操作步骤

1. 自备材料: 氯仿、无水乙醇、RNase-free 枪头等。
2. 首次使用试剂盒前, 在漂洗液 RW 中加入 70 ml 无水乙醇, 并进行标注。

##### 样本处理

- 1) 动物组织
  - a. 匀浆处理: 取新鲜组织, 每 50-100 mg 加入 1mL 的裂解液 RL 后用玻璃匀浆器或者电动匀浆器进行匀浆, 直至无明显组织块即可。

【注】：冰上进行匀浆，防止局部温度瞬时升高导致 RNA 降解。

- b. 液氮研磨：将液氮研磨好的粉末立即转移到裂解液 RL 中，按每 50-100 mg 加入 1mL 裂解液 RL，涡旋震荡直至无明显粉末团即可。

【注】：匀浆完或者液氮研磨后的样本，若不立即提取，可置于-80°C保存

## 2) 培养细胞

- a. 贴壁细胞：不需消化，吸除细胞培养基上清后可直接在培养皿中立即使用 RL 进行消化、裂解；或用胰酶消化后离心收集细胞加入 RL，每 $<5 \times 10^6$ 个细胞加入 500  $\mu$ l 的 RL，涡旋震荡直至无明显细胞团即可。
- b. 悬浮细胞：直接离心收集细胞，加入 RL，每 $<5 \times 10^6$ 个细胞加入 500  $\mu$ l 的 RL，涡旋震荡直至无明显细胞团即可。

【注】：细胞裂解后的样本，若不立即提取，可置于-80°C保存

## RNA 提取

以下过程均在无 RNase 污染的环境中进行

- 1) 将匀浆样品剧烈震荡混匀，在 15-30°C 条件下孵育 5 min 以使核蛋白体完全分解。
- 2) 每 1 mL RL 加 0.2 mL 氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡 15 sec 并将其在室温下孵育 3 min。
- 3) 于 4°C 12,000 rpm 离心 10 min，样品会分成三层：下层有机相，中间相和上层无色的水相，RNA 存在于水相中。水相层的容量大约为所加 RL 体积的 60%，把水相转移到新管中，进行下一步操作。
- 4) 加入 1 倍体积 70%乙醇 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**)，颠倒混匀 (此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中 (吸附柱套在收集管内)。
- 5) 12,000 rpm 离心 45 sec，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
- 6) 加 400  $\mu$ l 去蛋白液 RE，12,000 rpm 离心 45 sec，弃掉废液。
- 7) 加入 500  $\mu$ l 漂洗液 RW (**请先检查是否已加入无水乙醇!**)，12,000 rpm 离心 45sec，弃掉废液。
- 8) 加入 500  $\mu$ l 漂洗液 RW，12,000 rpm 离心 45 sec，弃掉废液。
- 9) 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
- 10) 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，根据预期 RNA 产量往吸附膜的中间部位加 50-80  $\mu$ l RNase free H<sub>2</sub>O (事先在 65°C 水浴中加热效果更好)，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min。如果需要较多 RNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心 1 min。

## 注意事项

1. 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
2. 为防止 RNA 降解，所有离心步骤如未加说明，均在 4°C 低温进行。
3. 检测 OD260/OD280 吸光度比值时，RNA 样品应该溶于 TE 后检测，如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和 PH 值低，会使 OD280 升高，从而使比值降低。
4. 操作实验时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。