

## 柱式超纯动物 RNA 小提试剂盒

货号：AC13988

规格：50T

保存：常温，其中 RNase-free DNase 4℃ 保存，12 个月。

### 产品说明：

本产品利用 RNA 在特定缓冲体系下能够高效结合硅基质材料的原理，采用硅胶膜离心吸附柱，适用于从培养细胞和动物组织中提取总 RNA，可以有效提取分子量大于 200 nt 的 RNA。提取过程中，无需使用苯酚氯仿等，采用 DNase 柱上处理，彻底去除基因组 DNA 残留，提取的 RNA 样品经 PCR 检测不含基因组 DNA，且极少含蛋白质和其它杂质的污染。本产品操作简单快速，且提取的 RNA 纯度高，可直接用于 RT-PCR、Northern blot、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

### 产品组份：

组分	50T	注意事项
柱平衡液	30 mL	
Proteinase K	0.6 mL	
组织/细胞裂解液	40 mL	
漂洗液 1 (WB1)	40 mL	
漂洗液 2 (WB2)	12 mL	初次使用前请按瓶标加入无水乙醇 (48 mL)
RNase-free DNase (2000 U)	1 瓶	4℃ 保存
膜反应液	4 mL	
RNase-free ddH <sub>2</sub> O (管装)	1 mL	
RNase-free ddH <sub>2</sub> O (瓶装)	15 mL	
RNase-free 注射器	1 支	
吸附柱	50 个	
2 mL 收集管	50 个	
1.5 mL RNase-free 离心管	50 个	

### 实验准备

用户需自备试剂： $\beta$ -巯基乙醇

1. RNase-free DNase 母液的配制：用 1 mL RNase-free 注射器吸取 550  $\mu$ L RNase-free ddH<sub>2</sub>O，打进装有 RNase-free DNase (2000 U) 干粉的玻璃瓶中，轻柔混匀，分装后 -20℃ 保存 (可保存 9 个月)。

注：从 -20℃ 融化后的 RNase-free DNase 母液保存于 4℃ (可保存 6 周)，不要再次冻存。

2. 组织/细胞裂解液可能会形成沉淀，请于 60℃ 加热溶解，然后恢复至室温后使用。请根据所

提取样品数量确定需要的“组织/细胞裂解液”的用量，并吸取转移至一个新的离心管中，再添加所取“组织/细胞裂解液”体积 1%的 $\beta$ -巯基乙醇。建议该裂解液现用现配。若配好的裂解液没有用完，可在 4℃ 保存 1 个月。

3. 初次使用前请在漂洗液 2 (WB2) 中按瓶标加入 48 mL 无水乙醇，并做好标记。

### 操作步骤——培养细胞

1. 柱平衡：将吸附柱放入 2 mL 收集管中，向吸附柱中加入 500  $\mu$ L 柱平衡液，12000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中的废液。请使用当天处理过的柱子。

2. 细胞裂解：

1) 贴壁细胞：彻底吸弃培养液，按照每 6-10  $\text{cm}^2$  面积加入 600  $\mu$ L 组织/细胞裂解液（使用前请新鲜加入 $\beta$ -巯基乙醇），用移液器吹打 3-5 次使细胞裂解。

2) 细胞悬液：500 x g 离心收集细胞，彻底吸弃培养液，每  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  细胞加入 600  $\mu$ L 组织/细胞裂解液（使用前请新鲜加入 $\beta$ -巯基乙醇），用移液器吹打 3-5 次使细胞裂解。

3. 12000 rpm 离心 2 min，小心吸取上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中，尽量避免触及管中的细胞碎片沉淀。

4. 缓慢加入 0.5 倍滤液体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱（吸附柱放在收集管中），12000 rpm 离心 30 s，弃除收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

5. 向吸附柱中加 350  $\mu$ L 漂洗液 1 (WB1)，12000 rpm 离心 30 s，弃除收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

6. RNase-free DNase 工作液的配制：取 10  $\mu$ L RNase-free DNase 母液放入新的 RNase-free 离心管中，加 70  $\mu$ L 膜反应液轻柔混匀。

7. 向吸附柱中央加入 80  $\mu$ L RNase-free DNase 工作液，室温放置 15 min。

8. 向吸附柱中加入 350  $\mu$ L 漂洗液 1 (WB1)，12000 rpm 离心 30 s，弃除收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入 500  $\mu$ L 漂洗液 2 (WB2)（使用前请先检查是否已加入乙醇），12000 rpm 离心 30 s，弃除收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

10. 重复操作步骤 9 一次。

11. 室温 12000 rpm 离心 3 min，此步骤十分重要，否则残留的乙醇（WB2 中的成分）会影响 RNA 的使用。

12. 将吸附柱放入一个新的 1.5 mL 无菌离心管中，向吸附柱中央加入 50-100  $\mu$ L RNase-free ddH<sub>2</sub>O，室温放置 1 min，12000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液。所得 RNA 溶液应立即使用或适量分装后存放于 -80℃ 待用。

### 操作步骤——动物组织

1. 柱平衡：将吸附柱放入 2 mL 收集管中，向吸附柱中加入 500  $\mu$ L 柱平衡液，12000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中的废液。请使用当天处理过的柱子。

2. 组织匀浆及裂解：

1) 液氮研磨：取 300  $\mu$ L 组织/细胞裂解液（使用前请先检查是否已加入 $\beta$ -巯基乙醇）加入到 1.5 mL 离心管中。组织样品经液氮研磨后，将研磨成粉末状的样品（10-20 mg）加入到上述含有 300

μL 组织/细胞裂解液的 1.5 mL 离心管中，剧烈震荡混匀直至裂解液中无明显沉淀。

2) 电动匀浆器：取 300 μL 组织/细胞裂解液（使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇）加入到 1.5 mL 离心管中，取 10-20 mg 的组织加入上述含有 300 μL 组织/细胞裂解液的离心管中，使用电动匀浆器彻底研磨。

3) 向上述组织裂解混合物中加入 590 μL RNase-free ddH<sub>2</sub>O 和 10 μL Proteinase K，混匀后 56℃ 孵育 10-20 min。

注：组织样品不能超过 20 mg，否则提取 RNA 的得率和纯度会下降。

3. 12000 rpm 离心 2 min，小心吸取消管中的上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中，尽量避免触及管中的细胞碎片沉淀。

4. 缓慢加入 0.5 倍上清液体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱（吸附柱放在收集管中），12000 rpm 离心 30 s，弃除收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

5. 向吸附柱中加 350 μL 漂洗液 1（WB1），12000 rpm 离心 30 s，弃除收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

6. RNase-free DNase 工作液的配制：取 10 μL RNase-free DNase 母液放入新的 RNase-free 离心管中，加 70 μL 膜反应液轻柔混匀。

7. 向吸附柱中央加入 80 μL RNase-free DNase 工作液，室温放置 15 min。

8. 向吸附柱中加入 350 μL 漂洗液 1（WB1），12000 rpm 离心 30 s，弃除收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入 500 μL 漂洗液 2（WB2）（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12000 rpm 离心 30 s，弃除收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

10. 重复操作步骤 9 一次。

11. 室温 12000 rpm 离心 3 min。此步骤十分重要，否则残留的乙醇（WB2 中的成分）会影响 RNA 的使用。

12. 将吸附柱放入一个新的 1.5 mL 无菌离心管中，向吸附柱中央加入 50-100 μL RNase-free ddH<sub>2</sub>O，室温放置 1 min，12000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液。所得 RNA 溶液应立即使用或适量分装后存放于-80℃待用。

### 注意事项：

1. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。请勿存放于普通住宅区。

2. 为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。

