总 RNA 提取试剂盒

（离心柱型） / 目录号：TR01

产品内容

产品组成	TR01 / (50 preps)
裂解液 RL (Buffer RL)	30ml（使用前加入 300ul 的巯基乙醇）
溶液 RW (Buffer RW)	55ml
DNase I (4U/10ul)	600ul
DNA 消化缓冲液 (Buffer RDD)	5ml
漂洗液 PW (Buffer PW)	16ml（使用前加入 64ml 无水乙醇）
无酶双蒸水(RNase-Free ddH_2O)	45ml
无酶离心管(RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5ml)	50 个
无酶过滤柱 CS1(Filtration Columns CS1)	50 套
无酶吸附柱 CR1(Spin Columns CR1)	50 套

选配的试剂

蛋白酶K（20mg/ml）目录号：GF0202-01，客户自备，提取动物组织总RNA时需配备；

溶菌酶（50mg/ml）目录号：GF0203-01，客户自备，提取细菌总 RNA 时需配备。

自备试剂

β-巯基乙醇、无水乙醇

储存条件

DNase I（DNase I 冻干粉溶解于专用保存液），储存于-20℃；其他试剂室温（15-25℃）保存。

产品简介

总RNA提取试剂盒提供了快速简单且有效的方法，可从各种动物组织、培养细胞及细菌、植物组织、中提取总RNA。本试剂盒采用离心管柱的方式，配合使用我司独特的硫氰酸胍裂解液，使组织或细胞裂解及均质化，并加入乙醇使RNA选择性的与管柱膜结合，于操作过程中加入DNase Ⅰ以去除残留的基因组DNA，经过多次“洗涤及离心”的步骤去除污染杂质，再以无核酸酶水回收结合在管柱膜上的RNA。若RNA小于200nt,如5sRNA、tRNA和microRNA,无法在此系统中被有效地回收。提取的总RNA纯度高，基本没有DNA和蛋白质污染，可用于PCR、芯片分析、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。

本试剂盒同样适用酵母，可以从酵母菌中提取总RNA,具体操作方法见“附录Ⅰ”。

本试剂盒也可用于将以其他方法提取的 RAN 进行 clean up 或去除基因组 DNA 污染，详见“附录Ⅱ”。

预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套，因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在裂解液RL中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4h,塑料器皿可在0.5M NaOH中浸泡10min,然后用水彻底清洗,再灭菌,即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用无RNase的水（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(V/V)，高压灭菌）。

使用前注意事项

1. 裂解液 RL：使用前请添加 300ul 巯基乙醇，**添加过巯基乙醇的裂解液 4℃保存。**
2. 漂洗液 PW：使用前请添加 64ml 无水乙醇。
3. 为确保 RNA 的品质及产量，应尽量收取新鲜的动物组织进行 RNA 提取，或将组织立即以液氮冷冻，储存于-70℃，组织亦可保存在 RANstore 样本保存液（目录号：TR38）中。样本保存在 RNAstore 试剂中，可于 37℃存放 1 天、4℃存放 1 个月、-20℃永久保存，所提取的 RNA 品质与储存在液氮中相同。

操作步骤

一、从培养细胞中提取总 RNA

1. 收集细胞
   a. 悬浮细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 1×10^7）：估计细胞数量，300×g 离心 5min，将细胞收集到离心管中，仔细吸除所有培养基上清。
   b. 单层贴壁细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 1×10^7）：可直接在培养容器中裂解（容器直径不超过 10cm），或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀。（在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法。）
      - 直接裂解法：确定细胞数量，彻底吸除细胞培养基上清，立即进行第 2 步裂解步骤。
      - 胰蛋白酶处理法：确定细胞数量，吸除培养基，用 PBS 洗涤细胞，吸除 PBS，向细胞中加入含有 0.10-0.25%胰蛋白酶的 PBS 处理细胞，当细胞脱离容器壁时，加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶，将细胞溶液转移至 RNase-Free 的离心管中，300×g 离心 5min，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清。

   注意：收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净，否则会导致裂解不完全，影响 RNA 与吸附柱的结合，造成 RNA 的产量降低;请勿使用过多的样本量，避免管柱杜塞而造成 RNA 的产量降低。
2. 裂解处理
   a. 对于离心得到的细胞沉淀：轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加入适量裂解液 RL**（详见下表，使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇）**，旋涡震荡混匀。

沉淀细胞数量	裂解液 RL(ul)
$<5\times10^6$	350
5×10^6-1×10^7	600

   b. 对于直接裂解的细胞：加入适量裂解液 RL**（详见下表，使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇）**，将细胞裂解液转移至离心管中，涡旋震荡混匀。

容器直径（cm）	裂解液 RL(ul)
<6	350
6-10	600

3. 将所有溶液转移至过滤柱 CS1 上(过滤柱 CS1 放在收集管中)，12,000rpm(~13,400×g)离心 2min，收集滤液。
4. 向滤液加入等体积 70%乙醇至裂解液中，混匀（此时可能会出现沉淀），转至后面**“RNA 提取步骤”。**

二、从动物组织中提取总 RNA

1. 匀浆处理：

   每 10-20mg 组织加 300ul 裂解液 RL（**使用前请先检查是否已加入 β-巯基乙醇**），用研磨杵将组织彻底研磨（如组织较难彻底研磨，可选用电动或玻璃匀浆器）；随后向匀浆液 中加入 590ul RNase-Free ddH2O 和 10ul Proteinase K（20mg/ml），混匀后 56℃处理 10-20min。

注意：组织量一定不要超过 20mg，否则将导致 RNA 得率和质量下降。

2. 将裂解混合液转移至过滤柱 CS1(过滤柱 CS1 放入收集管中)，12,000rpm(~13,400×g)离心 2min，收集滤液。

3. 向滤液加入 0.5 倍上清体积的无水乙醇，均匀（此时可能会出现沉淀），转至后面**“RNA 提取步骤”。**

三、从细菌中提取总 RNA

1. 4℃ 12,000rpm(~13,400×g)离心 2min 收集菌体（收集菌体的最大量不超过 1×10^9），仔细去除所有培养基上清，以后的所有离心步骤均在室温（20-25℃）进行。

注意：如果培养基上清去除不完全，将对第二步中的细胞壁消化过程产生抑制。

2. 用含有溶菌酶的 100ul TE 缓冲液（客户自己配制，配制方法见下表）彻底重悬菌体，孵育时间见下表。

	TE 缓冲液中的溶菌酶终浓度	孵育时间（室温）
G-细菌	400 g/ml	3-5 min
G+细菌	3 mg/ml	5-10 min

3. 加入 350ul 裂解液 RL**（使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇）**，涡旋振荡混匀。

4. 将裂解混合液转移至过滤柱 CS1 上(过滤柱 CS1 放入收集管)，12,000rpm(~13,400×g)离心 2min，收集滤液。

5. 向滤液中加入 250ul 无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），转至后面**“RNA 提取步骤”。**

四、从植物组织中提取总 RNA

本试剂盒<u>不适用于</u>富含淀粉、酚类和次级代谢物的植物组织（例如一些木本植物，胚乳或丝状真菌的菌丝体），因为 2-ME/裂解液在加入至样本粉末后，会变固态或非常粘稠,此类植物组织请使用<u>**“多糖多酚植物总 RNA 提取 kit”（货号 TR02）**</u>。

1. 匀浆处理

50-100mg 植物叶片在液氮中迅速研磨成粉末，加入 450ul 裂解液 RL（**使用前请先检查是否已加入 β-巯基乙醇**），涡旋剧烈震荡混匀，并于 56℃孵育 3 分钟。

注意 1：在 56℃孵育 1-3min 将有助于植物组织裂解，但是对于某些富含淀粉的样品，请不要加热处理，防止因淀粉引起的样品膨胀现象。

注意 2：由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的 RNA 含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

2. 将所有溶液转移至过滤柱 CS1 上(过滤柱 CS1 放在收集管中)，12,000rpm(~13,400×g)离心 2-5min，小心吸取收集管中的上清至 RNase-Free 的离心管中，吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。

注意：由于裂解液较粘稠，所以将溶液转移至过滤柱时，可以剪去部分吸头末端。

3. 缓慢加入 0.5 倍上清体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），转至**“RNA 提取步骤”。**

◆ RNA 提取步骤

此为续接**样本制备“一、二、三、四、五”**后的 RNA 提取操作步骤。

1. 将前一步所得“裂解液/乙醇混合液”（含沉淀），移取至吸附柱 CR1 中（吸附柱 CR1 放入收集管中），12,000rpm(~13,400×g)离心 30-60sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

注意：将溶液和沉淀转移至吸附柱 CR1 时，如果体积大于吸附柱容量，可以分次完成。

2. 向吸附柱 CR1 中加入 500ul 溶液 RW，12,000rpm(~13,400×g)离心离心 1min，丢弃滤液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

3. DNase Ⅰ 降解。

每一纯化反应，请将 80ul DNA 消化液（Buffer RDD）与 10ul DNase Ⅰ 预先混合在新的离心管(轻弹或翻转离心管以混合均匀，请勿震荡)，将 90ul“DNase Ⅰ工作液”加入至吸附柱的膜中心，于室温（25-28℃）孵育 15min。

注意：如同时操作多组样本，请使用前现配新鲜的 DNase Ⅰ工作液,请勿预先配制保存 DNase Ⅰ工作液。

4. 向吸附柱 CR1 中加入 500ul 溶液 RW，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。
5. 向吸附柱 CR1 中加入 600ul 漂洗液 PW**（使用前请先检查是否已加入乙醇）**，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。
6. 重复操作步骤 5。
7. 12,000rpm(~13,400×g)离心 3min，将吸附柱 CR1 置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的乙醇。

注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱 CR1 在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的 RT 等实验。

8. 将吸附柱 CR1 转入一个新的 RNase-Free 离心管中，加入 30-100ul 无酶双蒸水至吸附柱的膜中心，室温静置 2min，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，得到 RNA 溶液。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 30ul，体积过小影响回收效率；RNA 溶液请于-70℃保存。

附录Ⅰ：从酵母菌中提取总 RNA

一、需要自备的试剂：

a. 溶壁酶（Lyticase）：目录号 GF0210-01

b. 山梨醇 buffer：

用0.1M磷酸钠缓冲液(pH7.4)配制1.2M 山梨醇;

0.1M磷酸钠缓冲液(pH7.4)的配制：77.4ml 0.1mol/L Na2HPO4+ 22.6ml 0.1mol/L NaH2PO4

二、操作步骤

1. 取酵母细胞（最多不超过5×10^7cells），12,000 rpm(~13,400×g)离心1min，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
2. 酵母细胞壁的破除：

酶法：向菌体中加入1ml山梨醇buffer，加入大约50U Lyticase（需自备，我司目录号：GF0210-01）充分混匀，30℃孵育30min，300×g离心5min，弃上清，收集沉淀。

注意：以上为5×10^7酵母细胞的Lyticase用量，根据酵母的菌株和酵母细胞数量的不同，所用Lyticase的浓度和孵育时间应该进行适当调整。

3. 加入 350ul 裂解液 RL**（在使用前请加入 β-巯基乙醇）**，涡旋振荡混匀，将裂解混合液转移至过滤柱 CS1 上(过滤柱 CS1 放入收集管中)，12,000rpm(~13,400×g)离心 2min，收集滤液。
4. 向滤液中加入 350ul 70%乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），转至上面**“RNA 提取步骤”。**

附录Ⅱ：RNA Clean -Up 或基因组 DNA 去除。

本试剂盒可用于将以其他方法提取的 RAN 进行 clean up 或去除基因组 DNA 污染。

1. 将 RNA 以无酶水调整体积至 100ul，加入 350ul 的裂解液 RL**（使用前请加入 β 巯基乙醇）**，混合均匀。
2. 加入 250ul 的无水乙醇至裂解液中，混匀，转至上面**“RNA 提取步骤”。**