

RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒

RNApure Rapid RNA Kit

产品信息:

试剂盒组成	保存	RA103-01 20 次	RA103-02 50 次
裂解液 RL	4℃	25 ml	50 ml
氯仿替代物	室温避光	5ml	5ml
去蛋白液 RE	室温	25 ml	50 ml
漂洗液 RW	室温	5 ml 第一次使用前加入 4 倍体积无水乙醇	10 ml
H ₂ O(RNase-free)	室温	10 ml	10 ml
70%乙醇	室温	9 ml H ₂ O(RNase-free) 第一次使用前加入 21 ml 无水乙醇	18 ml H ₂ O(RNase-free) 第一次使用前加入 42 ml 无水乙醇
DNase I-XT	-20℃	200 μl	500 μl
缓冲液 RDD	-20℃	1 ml×2	1 ml×4
RNase-free 吸附柱 RA	室温	20 个	50 个
收集管 (2 ml)	室温	20 个	50 个
RNase-free 离心管 1.5 ml	室温	20 个	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 18 个月不影响使用效果。
裂解液 RL 可以常温运输, 收到后 4℃ 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, 总 RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 低盐的 H₂O(RNase free)将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

自备试剂: 乙醇

注意事项:

1.所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度过低, 溶液可能会形成沉淀, 此时不应该

直接使用，可在 37℃ 水浴加热，直至溶液恢复澄清。

2. 不合适的低温（4℃ 或者 -20℃）储存会造成溶液沉淀，影响使用效果。

3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

4. 裂解液 RL 和去蛋白液 RE 中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**

5. 加入裂解液 RL 匀浆后，加氯仿替代物前，样品可在 -70℃ 至 -80℃ 保存一个月。

操作步骤：

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70% 乙醇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！

1. 匀浆处理

a. 组织

用玻璃或强力匀浆器搅匀组织样品，保存于液氮内样品需要用研钵磨碎，每 50~100 mg 组织加 1 ml 的裂解液 RL 后匀浆。组织样品容积不能超过 RL 容积的 10%。

b. 单层生长的细胞

在直径 3.5 cm 的培养板中直接加入 1 ml 的裂解液 RL 溶解细胞，并用移液枪轻轻吹打混匀。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的裂解液 RL 量（每 10 cm² 加 1 ml）。一般情况下，普通大小的细胞培养瓶，加入 1 ml 的裂解液 RL，迅速轻摇使 RL 充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活 RNA 酶，轻轻用移液枪反复吹打混匀。当 RL 用量不足时可导致抽提的 RNA 中有基因组 DNA 污染。

c. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。每 5~10×10⁶ 个动物细胞 1 ml 的裂解液 RL，用移液枪反复吹打来裂解细胞。在加入裂解液 RL 前应避免洗涤细胞，否则会增加 mRNA 降解的可能性。

破裂细菌需要溶菌酶处理，酵母等真菌需要破壁酶处理或者使用匀浆器。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀，在 15 -30℃ 条件下孵育 5 min 以使核蛋白体完全分解。

3. 每 1 ml 裂解液 RL 加 0.1 ml 氯仿替代物。盖紧样品管盖，剧烈振荡 15 sec 并将其在室温下孵育 3 min。

4. 于 4℃ 12,000 rpm 离心 10 min，样品会分成三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相，RNA 存在于水相中。水相层的容量大约为所加裂解液 RL 体积的 60%，把水相转移到新管中，进行下一步操作。

5. 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 and 可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中（吸附柱套在收集管内）。

6. 12,000 rpm 离心 45 sec，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。

- 7.加400 μ l去蛋白液RE, 12,000 rpm 离心45 sec, 弃掉废液。
- 8.DNase I-XT 工作液的配制: 取10 μ l DNase I-XT 储存液放入新的RNase-free离心管中, 加入70 μ l RDD溶液, 轻柔混匀。
- 9.向吸附柱RA中央加入80 μ l DNase I-XT工作液, 室温放置5 min。
- 10.加400 μ l去蛋白液RE, 12,000 rpm 离心45 sec, 弃掉废液。
- 11.加入500 μ l漂洗液RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心45 sec, 弃掉废液。
- 12.加入500 μ l漂洗液RW, 12,000 rpm 离心45 sec, 弃掉废液。
- 13.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。
- 14.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 30-50 μ l H₂O(RNase free)(事先在 65℃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。