

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	25 ml×2
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
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	10 ml
70%乙醇	室温	9 ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前加入 21 ml 无水乙醇	9 ml RNase-free H ₂ O×2
DNase I	-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

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。

注意:

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。裂解液 RL 可以常温运输, 收到后 **4℃ 保存**。
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。

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 在高离序盐状态下选择性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 H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点：

- 1.离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
- 2.结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
- 3.独有的 RL 裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
- 4.有效的去除了 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。

注意事项：

- 1.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！
- 2.为防止 RNA 降解，所有离心步骤如未加说明，均在 4℃ 低温进行。使用转速可以达到 12,000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
- 3.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。**
- 4.常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析 RNA 的质量。好的 RNA 产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体 RNA 带，分别为 ~5Kb (28S)，~2Kb (18S)，条带亮度比值约为 2: 1。有时候也可以看到 ~0.1kb 和 0.3Kb (5S, tRNA) 带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到 4, 5 条带也属于正常现象，如果 RNA 未成熟的前体或者不均一核 RNA、小核 RNA 提取出来也可能看到介于 7Kb 和 15Kb 之间的不连续的高分子量条带。
- 5.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。
- 8.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。

自备试剂：无水乙醇

操作步骤：

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

直接往直径 3.5 cm 的培养板中加入 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。在裂解液RL试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。每5~10×10⁶个动物细胞，植物或酵母菌细胞或每1×10⁷细菌加1 ml的裂解液RL。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。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

2. 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。
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°C 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）。得到的溶液和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 μl去蛋白液RE，12,000 rpm 离心45 sec，弃掉废液。
8. DNase I工作液的配制：取10 μl DNase I储存液放入新的RNase-free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀。
9. 向吸附柱RA中央加入80 μl DNase I工作液，室温放置15 min（一般情况下室温放置可得到较好的消化效果，如果室温效果不佳可选择在37°C放置15 min）。
10. 加400 μl去蛋白液RE，12,000 rpm 离心45 sec，弃掉废液。
11. 加入500 μl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 μl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 50-80 μl RNase free H₂O（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。