

# 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℃避光	25 ml	50 ml
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 <sub>2</sub> O	室温	10 ml	10 ml
70%乙醇	室温	9 ml RNase-free H <sub>2</sub> O 第一次使用前加入 21 ml 无水乙醇	9 ml RNase-free H <sub>2</sub> 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
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 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℃避光保存**。
- 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 H<sub>2</sub>O 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. 考虑到环保问题，本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，用户使用前需要自备氯仿。
5. 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。
6. 检测OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>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OD<sub>280</sub>升高，从而使比值降低。
7. 加入裂解液RL匀浆后，加氯仿前，样品可在 -70℃至-80℃保存一个月。

**自备试剂：**氯仿、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RL量（每10 cm<sup>2</sup>加1 ml）。一般情况下，普通大小的细胞培养瓶，加入1 ml的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RL试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。每5~10×10<sup>6</sup>的动物细胞，植物或酵母菌细胞或每1×10<sup>7</sup>细菌加1 ml的RL。在加入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 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。
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 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。

对于 RNA 含量少 ( $\leq 5 \mu\text{g}$ ) 的样品，可以选择购买本公司微量 RNA 吸附柱（货号：QA3101），此吸附柱最小洗脱体积为  $5 \mu\text{l}$ ，可提高 RNA 的洗脱浓度，帮助后续实验的进行。

BM190625