

组织总 RNA 快速提取试剂盒

货号: HKR06

【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
组织总 RNA 快速提取试剂盒	HKR06	50T	18 个月

【产品简介】

本试剂盒是用于从动物组织和细胞样本中经柱式法提取纯化 RNA 的广谱型试剂盒。试剂盒采用了特别的裂解缓冲系统, 无需氯仿等有机试剂抽提, 并分别经过 gDNA EraserSpin Column (去除基因组 DNA) 以及 RNA Spin Column (结合 RNA), 可从 5-20 mg 的动物组织、106-107 新鲜培养的细胞中快速提取高纯度的 RNA, 整个提取过程仅需 30 min 即可完成。获得的 RNA 可以直接用于 Northern 杂交、斑点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RNA 分解酶的保护分析、RT-PCR、Real Time RT-PCR 和构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

【产品组成】

货号	名称	规格
HKR06A	裂解液	50mL
HKR06B	漂洗液	25mL
HKR06C	无 RNA 酶水	10mL
HKR06D	萃取液	12mL
HKR06E	RNA 吸附柱收集管套装	50 套

【储存与运输】

冰袋 (wet ice) 运输; 4℃ 避光保存, 有效期 18 个月。

【使用方法】

第一次使用前请先向漂洗液中加入 75mL 无水乙醇。

1. 样本匀浆

(1) 细胞

300g 离心 5min 收集悬浮细胞一个无 RNA 酶离心管, 完全吸弃上清, 留下细胞沉淀, 加 1 mL 裂解液, 剧烈荡 20 混, 充分解。贴壁细胞可以直接加入 1 mL 裂解液, 用细胞刮刮取细胞, 将

解液收集至无RNA酶EP管中，剧烈荡20s，充分裂解。加裂解液之前不要洗涤细胞以免mRNA降解。

2) 动物组织

1. 将新鲜组织(20~50mg)剪切成小碎块,放入无RNA酶EP管中,加入3-5颗无RNA的氧化锆珠,加入1mL解液,用预冷4°的组织研磨仪震荡研磨,直至无肉眼可见的组织沉淀。

2. 液氮研磨:在液氮中研磨组织成细粉后,收集至无RNA酶EP管中,加1mL裂解液,剧烈荡20s混,充分裂解。2. 将匀浆样品在室温(15-30)放置5分钟,使核酸蛋白复合物完全分离。

3. 可选步骤:如样品中含有较多蛋白质,脂肪,多或胞外物质(肌肉,植物结节部分等)可于2-8°C 10000x离心10分钟,取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜,多糖,高分子量DNA,上清中含有RNA。处理脂肪组织时,上层有大量油脂应去除。取澄清的匀浆液进行下一步操作。

4. 每使用1mL裂解液加入0.2mL萃取剂,剧烈振荡15秒,室温放置3分钟。

5. 2-8°C 12000rpm离心15分钟。样品分为三层:底层为有机相,上层为无色水相和一个中间层。RNA主要在水相中。

6. 把水相转移到RNA上层吸附管中(如要分离DNA和蛋白质可保留有机相)12000rpm离心2min,弃下层收集管中的液体。

7. 上层吸附管中加入600u漂洗液(已加入75mL无水醇),12000rpm离心2min,弃下层收集管中的液体

8. 重复一次步骤7。

9. 将RNA吸附柱放回空收集管中,12,000rpm离心3min,尽量除去漂洗液以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

10. 将上层吸附管转移至新的无RNA酶EP管中,打开上层吸附管管盖,室温放置干燥RNA沉淀,不要晾得过干,否则不易溶解,大约晾5-10分钟。加入30-100yL无RNA酶水,放置3min使RNA溶解,12000rpm离心5min,下层的EP管中的液体便是提取好的RNA。

11. 如果提取的RNA浓度较低,将步骤10中的RNA洗脱液回到上层吸附管中,放置3min使RNA溶解,12000rpm离心5min。

DNA分离

准备试剂:乙醇0.1M柠檬酸钠(含10%乙醇)75%乙醇8mMNaOH操作步骤:

1. 样品加萃取剂分层后,移去上层水相,用乙醇沉淀中间层和有机相中的DNA。每使用1mL总RNA提取试剂加0.3m无水乙醇混匀,室温放置3分钟,2-8°C不超过2000xg离心5分钟。

2. 移去上清,(如需要分离蛋白质,可保留,进一步操作见后)用含10%乙醇的0.1M柠檬酸钠洗涤DNA沉淀。每用1mL总RNA提取试剂加入1mL柠檬酸钠,室温放置30分钟,2-8°C 2000xg离心5分钟,弃上清,重复一次。

3. 用75%乙醇再洗一遍DNA沉淀，每使用1ml总RNA提取试剂加入1.5-2ml75%醇，室温放置10-20分钟(不时颠倒混合)2-8℃，2000×g离心5分钟，弃上清。

4. 室温放置晾DNA 5-15分钟，用8mMNaOH溶解DNA。从50-70mg组织或10⁷细胞中分离的DNA溶于300-600ul8mMNaOHDNA的浓度通常为0.2-0.3ug。提取的DNA沉淀不易溶于水和Ts缓冲液中，建议用弱碱溶解，8mMNaOH的pH值为9，溶解DNA后可用TE，HEPES 调节pH。从某些样品(尤其是组织)中提取的DNA中可能包含一些胶状不溶物可>12000xg 离心10分钟除去。DNA的定量：取一份溶于8mMNaOH的DNA加水测A260值。一单位A260值相当于50ug/m双DNA。根据DNA产量可估计细胞数，人，大鼠，小鼠1x10⁶二倍体细胞含DNA的量分别为7.1ug, 6.5ug, 5.8ug。预期产量：1mg组织或1x10⁶细胞提取DNA分别为：肝和肾3-4ug, 骨骼肌，脑组织，胎盘2-3ug人，大鼠，小鼠培养细胞(1x10⁶) 5-7ug, 成纤维细胞5-7ug。

实验注意：

1. DNA在中间层和有机相中时可在2-8℃保存过夜
2. DNA沉淀在75%乙醇中2-8℃可保存几个月。
3. DNA在8mMNaOH溶液中4℃可放置过夜，如长期保存需用HEPES调节pH至7-8并且加EDTA至1mM可置于-20℃长期保存。

蛋白质的提取

准备试剂：异丙醇含0.3M盐酸胍的95%乙醇无水乙醇1%SDS操作步骤：

1. 取沉淀DNA后剩余的上清，用异丙醇沉淀蛋白质。每使用1ml总RNA提取试剂加1.5ml异丙醇，室温放置10分钟，2-8℃12000xg离心10分钟弃上清。

2. 用含0.3M盐酸胍的95%乙醇洗涤蛋白质沉淀。每使用1ml总RNA提取试剂加2ml洗涤液，室温放置20分钟，2-8℃7500xg离心5分钟，弃上清，重复两次。用2ml无水乙醇同样方法再洗一次

3. 真空抽干蛋白质沉淀5-10分钟，用1%SDS溶解蛋白质，反复吸打，50℃温浴使其完全溶解，不溶物2-8℃10000xg离心10分钟除去。分离得到的蛋白质样品可用于Westernblot 或-5-20℃保存备用。实验注意：

4. 蛋白质沉淀可保存在含0.3M盐酸胍的95%乙醇或无水乙醇中2-8℃一个月以上或-5-20℃一年以上。

5. 用0.1%SDS在2-8℃透析三次，10000xg离心10分钟取上清即可用于Westernblot。

【注意事项】

1. 本产品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会引起中毒、灼伤及其他身体伤害。使用时应穿戴防护物，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不小心接触到眼睛时，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。
2. 请穿实验服并佩戴一次性手套操作，避免 RNase 污染。3. 需自备 75%醇(DEPC 处理水配制) DEPC 处理水。
3. 样品用裂解液匀浆后，如果不加入萃取剂进行下游实验，可先 -80°C 冻存，可保存一个月以上。
4. RNA 沉淀在 75%乙醇中， 4°C 可保存 1 周， -20°C 可保存 1 年。
5. RNA 半衰期比较短，易降解，建议抽提后尽快进行后续实验。
6. 敬告本产品仅作科研用途，勿用于其他用途。