

组织/细胞 RNA 提取试剂盒(gDNA 清除柱)

货号： NG3001S 50次

试剂盒组成	保存	50 次
裂解/结合液 RB	室温	30 ml
漂洗液 RE	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10ml
RNase-free water	室温	5 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O
基因组 DNA 清除柱和收集管	室温	50 套
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

储存事项:

1. 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37°C水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温 (4°C或者 - 20°C) 会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温 (15°C - 25°C)。
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:

本产品运用最新的基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后裂解混合物通过一个基因组 DNA 清除柱，基因组 DNA 被清除而 RNA 穿透滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，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，将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚，氯仿，Beta 巯基乙醇等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速，简捷，单个细胞样品操作一般可在 15 分钟内完成。
3. 基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。

注意事项

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000 rpm的台式离心机即可。
2. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱和RNA吸附柱RA处理能力，否则造成DNA残留或者产量降低。如细胞不超过3-4x10⁶，组织不超过10mg。将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。

3. 裂解/结合液RB和漂洗液RE中含有盐酸胍/异硫氰酸胍化合物，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. 预防RNase 污染，应注意以下几方面：所有操作应尽可能在无酶的环境下进行（包括所有相关耗材）
5. 关于DNA 的微量残留：一般说来任何总RNA提取试剂在提取过程中无法完全避免DNA的微量残留（DNase消化也无法做到100%无残留），本公司的RNA提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组DNA清除柱技术，绝大多数DNA已经被清除，不需要DNase消化，可直接用于反转录PCR和荧光定量PCR。**个别特殊情况如DNA含量过于丰富造成残留，将RNA提取物用RNase-free的DNase I 处理以提高效果。**

HLINGENE

操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：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无水乙醇！

1. 培养细胞

A1. 贴壁细胞：不需消化，彻底吸干净培养液体后直接加推荐量裂解/结合液 RB（见附录一）反复吹打细胞裂解，取裂解后的匀浆液全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）直接接**操作步骤 3**；不方便直接裂解的培养容器，可以用细胞刮子刮下细胞，或者胰蛋白酶消化后吹打下来收集细胞到 1.5ml 离心管。

A2. 悬浮细胞：收集 $<10^7$ 悬浮细胞到一个 1.5ml 离心管。

B. 12,000rpm 离心 10 秒（或者 300g 离心 5 分钟），使细胞沉淀下来。完全吸弃上清，留下细胞团（注：不完全弃上清会稀释裂解液导致产量纯度降低）。轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加 350 μ l ($<5 \times 10^6$ 细胞) 或 600 μ l (5×10^6 - 1×10^7 细胞) 裂解/结合液 RB，用移液器反复吹打充分裂解（直到看不细胞团为止）。将裂解混合物全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

C. 立刻接**操作步骤 3**。

2. 动物组织（例如鼠肝脑）

A1. 匀浆器匀浆：新鲜组织加入 350 μ l (<20 mg 组织) 或者 600 μ l (20-30mg 组织) 的裂解/结合液 RB 后玻璃匀浆器或电动匀浆器将组织彻底研磨匀浆。

A2. 液氮研磨+匀浆：在液氮中研磨组织成细粉后，取适量组织细粉(20mg/30mg)转入装有 350 μ l/600 μ l 组织裂解/结合液 RB 的 1.5ml 离心管中，剧烈振荡 20 秒，难裂解样品可用移液器反复吹打匀浆。

注意：若研磨匀浆后不溶物碎片太多，可将匀浆后裂解物 12,000rpm 离心 3 分钟沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物。将上清液加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

B. 将研磨均匀的匀浆液全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

C. 立刻接**操作步骤 3**。

3. 立刻 12,000 rpm 离心 1 分钟，保留滤过液（RNA 在滤过液中）。**确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。**

4. 较精确估计滤过液体积（通常为 350 μ l/600 μ l，滤过时候损失体积应该减去，可用移液器吸取滤液估计体积），加入等体积的 70%乙醇（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，**立即吹打混匀**，立刻将混合物（每次小于 700 μ l，多可以分两次加入）加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

5. 加 700 μ l 漂洗液 RE，室温放置 30 秒，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

6. 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 30 秒，弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW，重复一遍。

7. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

8. 取出吸附柱 RA，放入一个干净 1.5ml 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜中间部位加 30-50 μ l RNase free water，洗脱缓冲液体积不应少于 30 μ l，室温放置 1 分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟得到 RNA 溶液。

附录一：贴壁培养细胞数量表

培养器皿	底面积 (cm ²)	加培养液量 (ml)	可获细胞量
24 孔培养板	2	1.0	5 \times 10 ⁵
6 孔培养板	9.6	2.5	2.5 \times 10 ⁶
3.5cm 培养皿	8	3.0	2.0 \times 10 ⁶
6cm 培养皿	21	5.0	5.2 \times 10 ⁶
25cm 塑料培养瓶	25	5.0	5.2 \times 10 ⁶
100ml 玻璃培养瓶	33	10.0	7 \times 10 ⁶

注：一般情况下，3.5cm 直径培养皿或者更小培养容器加 350 μ l 裂解/结合液 RB，6cm 直径培养皿或者更大培养容器加 600 μ l 裂解/结合液 RB。最大处理量不超过 10⁷ 个细胞。