

SteadyPure 通用型RNA提取试剂盒

SteadyPure Universal RNA Extraction Kit

Code No. AG21017

包装量: 50 rxns
保存温度: Package 2-1 -20°C
 Package 2-2 室温(15-25°C)

产品概述

本产品可从小于30 mg动物组织（肝脏、心脏、肾脏、脾脏、肠等）、小于100 mg植物组织（茎、叶、种子等）和小于1.0E+07个培养细胞（HL60、293T等）等生物样品中提取总RNA。试剂盒采用独特的裂解系统，无需有毒的酚氯仿抽提，能在迅速裂解组织或细胞的同时抑制细胞释放出的核酸酶，保持RNA的完整性。利用gDNA Eraser Mini Column或DNase I去除基因组DNA，再通过 *Universal RNA* Mini Column 获得高纯度、高收量的RNA。纯化获得的Total RNA可以直接用于Northern杂交、mRNA纯化、体外翻译、RT-PCR等各种分子生物学实验。如果有需要，可继续使用DNase I（Code No. AG12001）处理Total RNA以除去含有的微量DNA。

安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂，实验操作开始前请佩戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套，然后再进行实验操作。

注意：使用后溶液需要收集在废液桶中专门处理。

如果缓冲液不小心溅出，请立刻用大量清水冲洗，然后用浓度为1%的次氯酸钠溶液清洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

产品组成

50 × DTT Solution*1	700 μl
DNase I (RNase free) *1	200 μl
10 × DNase I Buffer*1	1 ml
Buffer RLS	15 ml × 2
Buffer RWA	30 ml
Buffer RWB*2	27 ml
RNase Free Water*3	13 ml
gDNA Eraser Mini Columns	50 sets
<i>Universal RNA</i> Mini Columns	50 sets
Collection tubes	50 pcs
RNase Free Tubes*4	50 pcs

*1 此三种组分包装于Package 2-1中，需放置于-20°C保存；其余组分均包装于Package 2-2 中，室温(15-25°C) 保存。

*2 Buffer RWB 在首次使用前，请添加63 ml的 100%乙醇（Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7），混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。

*3 开启后建议保存于-20°C。

*4 此组分仅用于洗脱RNA，前期裂解所用离心管需自备。

实验前准备

1. 自备：无水乙醇、70%乙醇、PBS、1.5 ml 离心管(RNase free)。
2. Buffer RLS 若出现沉淀，请于60°C加热溶解，待溶液恢复至室温后使用。
3. Buffer RWB 在首次使用前，请添加63 ml的 100% 乙醇（Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7），混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。
4. Buffer RLS 使用前需加入 50 × DTT Solution，至终浓度为1 × DTT Solution，即每1 ml的Buffer RLS 中加入 20 μl的50 × DTT Solution。此裂解Buffer 最好现用现配。加入50 × DTT Solution 的Buffer RLS 可在室温放置 1个月。

➤ 保存及运输

保存温度: Package 2-1 -20°C 保存;
Package 2-2 室温 (15-25°C) 保存。

运输温度: Package 2-1 干冰或-20°C冰袋运输;
Package 2-2 室温运输。

➤ 注意事项

1. 应尽量使用新鲜的实验材料, 以确保提取的 RNA 不被降解。
2. 使用液氮研磨组织材料时, 应随时加入液氮, 以确保提取的 RNA 不被降解。
3. 组织材料切勿超过最大起始量, 且要充分裂解, 否则会堵塞Mini Column, 影响RNA收量及纯度。如果样本量较大, 请适当增加试剂用量或使用多个 Mini Columns 进行纯化操作。
4. gDNA Eraser Mini Column 以及 *Universal RNA* Mini Column 的最大容积为700 μl, 使用时如果液体的体积超出最大容积, 请分批加入。
5. 操作过程中, 应预防RNase污染, 需注意以下几方面:
 - a) 使用 RNA 操作专用实验台, 经常更换新手套, 穿戴RNA专用实验服, 实验过程中尽量不要说话及来回走动, 操作过程中避免物品从离心管上方过。
 - b) 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的RNase污染。
 - c) 配制70%的乙醇溶液应使用无核酸酶的水。

➤ Buffer RLS 推荐用量

本产品单次可处理小于30 mg动物组织、小于100 mg植物组织和小于1.0E+07个培养细胞等生物样品。合适的样本量是获得理想收量和纯度的关键。样本量过多会导致裂解不充分、DNA消化不完全、堵塞纯化柱等问题, 最终导致RNA的收量及纯度降低。初次使用本产品时, 动物组织的起始量建议10 mg、植物组织的起始量建议50 mg、培养细胞的起始量建议1.0E+06, 再根据实验结果调整起始量, 以达到最佳提取效果。对于富含肌纤维 (肌肉、心脏、皮肤等)、富含脂类 (脂肪、脑等)、gDNA含量较高 (脾脏、肾脏等)、植物组织 (根、茎等) 等样本应当降低样本起始量或加大裂解液Buffer RLS的用量。实验前请参考Table 1 中不同组织样本推荐起始量和推荐Buffer RLS的使用量。

Table. 1 不同组织样本推荐起始量和推荐Buffer RLS 的使用量

推荐样本起始量	推荐Buffer RLS使用量
小于15 mg 动物组织	350 μl
小于30 mg 动物组织	600 μl
小于100 mg 植物组织	500 μl
贴壁培养细胞 (培养皿直径小于6 cm)	350 μl
贴壁培养细胞 (培养皿直径6 ~ 10 cm)	600 μl
小于5.0E+06个悬浮培养细胞	350 μl
5.0E+06 ~ 1.0E+07个悬浮培养细胞	600 μl

操作流程

动物、植物组织的裂解：

1. 将新鲜或-80℃冻存的动物、植物组织样品转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨动物、植物组织（研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮），直至研磨成粉末状（无明显可见颗粒，研磨不充分会影响样本的收量）。
2. 将适量已研磨成粉末状的样本转移至含有适量裂解液Buffer RLS（按Table 1中推荐的使用量，且在使用前确认Buffer RLS中已加入50×DTT Solution）的1.5 ml离心管（RNase free）中，立即高速涡旋混匀或用移液枪反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。

（注：若裂解匀浆比较粘稠，可使用小号注射器抽打裂解液5~10次打断DNA。针对柔软易裂解的组织样本，可以使用超低温匀浆器加入适量Buffer RLS进行匀浆裂解。）

3. 裂解液室温静置2分钟。
4. 12,000 rpm，4℃离心5分钟。
5. 小心吸取上清液至新的1.5 ml离心管（RNase free）。



样本的裂解处理

悬浮培养的动物细胞的裂解：

1. 8,000×g 4℃离心2分钟，将悬浮细胞收集至离心管底部，弃上清。
2. 使用1×PBS清洗一次，8,000×g 4℃离心2分钟，弃上清。
3. 向收集了适量培养细胞的离心管中加入适量的裂解液Buffer RLS（按Table 1中推荐的使用量，且在使用前确认Buffer RLS中已加入50×DTT Solution）。
4. 立即高速涡旋混匀或用移液枪反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。

（注：若裂解匀浆比较粘稠，可使用小号注射器抽打裂解液5~10次打断DNA）

5. 裂解液室温静置2分钟。

贴壁细胞的裂解：

1. 吸出培养液，细胞用1×PBS清洗一次。
2. 吸出PBS洗液，向适量的培养细胞中加入适量的裂解液Buffer RLS（按Table 1中推荐的使用量，且在使用前确认Buffer RLS中已加入50×DTT Solution），轻摇培养皿，确保Buffer RLS溶液均匀分布于细胞表面。
（注：对于贴壁牢固的培养细胞可用细胞刮勺剥离细胞；处理速度需快，立即进行后续操作）
3. 使用移液器反复吹打使细胞脱落，然后将内含细胞的裂解液转移至离心管中，高速涡旋振荡混匀或用移液器吹打直至裂解液中无明显沉淀（注：如裂解匀浆比较粘稠，可使用小号注射器抽打裂解液5~10次打断DNA）。
4. 裂解液室温静置2分钟。

纯化步骤：

注：若组织裂解液比较粘稠，可直接按纯化步骤3进行，否则会导致gDNA Eraser Mini Column堵塞，影响RNA收量及纯度。若未进行gDNA Eraser Mini Column去除gDNA，建议在纯化步骤6之后进行DNase I消化。

1. 将上述溶液转移至gDNA Eraser Mini Column中，12,000 rpm室温离心1分钟。
2. 弃gDNA Eraser Mini Column吸附柱，将Collection tube中的滤液转移至新的1.5 ml离心管（RNase free）。
3. 向组织裂解液或上述滤液中加入液体等体积的70%乙醇，用移液枪吹打混匀，若出现明显粘稠物或沉淀，用移液枪吹打多次，打散沉淀。

（注：若沉淀不散会导致Universal RNA Mini Column堵塞，影响收量及纯度。）



gDNA Eraser Mini Column
去除gDNA



➤ 操作流程

4. 立即将上述混合液和沉淀全部转移至 *Universal RNA* Mini Column 中, 12,000 rpm 室温离心 1 分钟, 弃滤液。
5. 向 *Universal RNA* Mini Column 中加入 600 μ l 的 Buffer RWA, 12,000 rpm 室温离心 1 分钟, 弃滤液。
6. 向 *Universal RNA* Mini Column 中加入 650 μ l 的 Buffer RWB, 12,000 rpm 室温离心 1 分钟, 弃滤液。
(注: 请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100% 乙醇)



Universal RNA Mini Column 吸附RNA
600 μ l Buffer RWA 洗1次

如需要DNA 酶消化, 请按照下述**可选步骤**进行。

7. 向 *Universal RNA* Mini Column 中加入 650 μ l 的 Buffer RWB, 12,000 rpm 室温离心 1 分钟, 弃滤液。
8. 将 *Universal RNA* Mini Column 的吸附柱安置于新的2.0 ml Collection Tube上, 12,000 rpm 室温离心 2 分钟。
(注: 此步骤需竖直将吸附柱取出, 避免吸附柱柱头触碰收集管壁; 安装于新的2.0 ml Collection Tube, 上有利于提高RNA纯度)
9. 将 *Universal RNA* Mini Column 的吸附柱安置于新的RNase Free Tube上, 在吸附柱膜的中央处加入50 μ l-200 μ l RNase Free Water, 室温静置 5 分钟, 然后12,000 rpm 室温离心 2 分钟洗脱 RNA, 将溶解后的RNA放入-80°C中保存。



650 μ l Buffer RWB 洗2次
空管离心2分钟



50 μ l-200 μ l
RNase Free Water 洗脱

可选步骤: DNase I 消化:

- ① 按下表配制DNase I 反应液并混匀。把50 μ l DNase I 反应液加到 *Universal RNA* Mini Column 的膜中央, 室温静置15分钟。

成分	用量
DNase I (RNase free)	4 μ l
10 \times DNase I Buffer	5 μ l
RNase free water	41 μ l

- ② 向上述 *Universal RNA* Mini Column 膜中央加入350 μ l Buffer RWB, 12,000 rpm 室温离心 1 分钟, 弃滤液。
- ③ 后续实验, 请按照上述纯化步骤7-9操作。