

SteadyPure RNA 提取试剂盒 (不含裂解液)

SteadyPure RNA Extraction Kit (without Lysis Buffer)

Code No. AG21024

包装量: 50 rxns
保存温度: 室温 (15-25°C)

产品概述

本产品为不含裂解液的 RNA 提取试剂盒, 包含有纯化柱与洗涤液, 与本公司产品 *AG RNAex Pro Reagent* (Code No. AG21101和 AG21102) 搭配使用, 将 *RNAex* 和柱膜法纯化方式相结合, 能快速从 $\leq 2.0E+07$ 个培养细胞和 ≤ 100 mg 组织等样本中提取总 RNA。样本经 *RNAex* 裂解后, 可不加氯仿抽提直接与乙醇混匀 (无氯仿抽提的方法); 也可加氯仿 (或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303) 抽提, 离心后取上清液与乙醇混匀 (氯仿抽提的方法)。然后将与乙醇混匀后的裂解液转移至 RNA Mini Column 中进一步纯化 RNA, 经洗涤液去除杂质和盐分, 最后用 RNase Free Water 洗脱获得高纯度的 RNA。纯化获得的 Total RNA 可以直接用于 RT-qPCR、RT-PCR、Northern 杂交、mRNA 纯化、二代测序等各种分子生物学实验。

如果将其他裂解液搭配本产品使用, 请先进行研讨, 确认提取效果; 同时需要根据裂解液的不同, 研讨合适的样本起始量及裂解液用量。

安全操作

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

【注意: 实验过程中产生的废液需要收集在废液桶中专门处理。】

如果 Buffer RW1、Buffer RW2 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

Buffer RW1	30 ml
Buffer RW2 ^{*1}	27 ml
RNase Free Water ^{*2}	13 ml
RNA Mini Columns	50 sets
Collection tubes	50 pcs
RNase Free Tubes ^{*3}	50 pcs

*1: Buffer RW2 在首次使用前, 请添加 63ml 的 100% 乙醇 (Buffer RW2 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。

*2: 开启后建议保存于 -20°C。

*3: 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、氯仿 (或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303) (可选)、1.5ml 离心管 (RNase free)。
2. Buffer RW2 在首次使用前, 请添加 63ml 的 100% 乙醇 (Buffer RW2 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。

保存及运输

保存温度: 室温 (15-25°C) 保存

运输温度: 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. 样本量勿超过最大起始量, 否则会使样本裂解不充分或堵塞 Mini Column, 影响 RNA 收量及纯度。如果样本起始量较大, 可适当增加裂解试剂 (如 *RNAex*) 用量以使样本裂解充分。
4. RNA Mini Column 的最大容积为 700 μ l, 使用时如果液体的体积超出最大容积, 可分次加入: 上样 700 μ l 裂解液后, 离心, 去滤液然后将剩余裂解液再次上样, 重复此步骤。

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经过。
- b) 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的 Rnase 污染。
- c) 使用无核酸酶的水准确配制 70% 的乙醇溶液，同时，确保配制好的 70% 乙醇无核酸酶污染。

➤ 推荐样本起始量及裂解液使用量

样本是否充分裂解是获得理想收量和纯度的关键。裂解液一定的情况下，样本量过多会导致裂解不充分、堵塞纯化柱等问题，最终导致RNA的收量及纯度降低。以 *AG RNAex Pro Reagent* (Code No. AG21101 和 AG21102) 为例，裂解液使用量及样本的起始量可参考下表 (Table. 1 不同样本起始量和 *RNAex* 使用量)。如果样本量过大，请增加 *RNAex* 的用量。

Table. 1 不同样本起始量和 *RNAex* 使用量

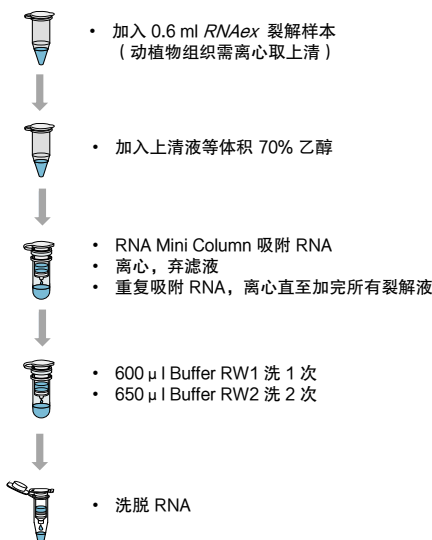
样本名称	无氯仿抽提		氯仿抽提	
	样本起始量	<i>RNAex</i> 使用量*1	样本起始量	<i>RNAex</i> 使用量*1
贴壁培养细胞	≤ 1X 10 ⁷	0.6 ml	≤ 2X 10 ⁷	1 ml
悬浮培养细胞	≤ 1X 10 ⁷	0.6 ml	≤ 2X 10 ⁷	1 ml
动物组织	≤ 30 mg	0.6 ml	≤ 50 mg	1 ml
植物组织	≤ 60 mg	0.6 ml	≤ 100 mg	1 ml
酵母细胞	≤ 3 X 10 ⁷	0.6 ml	≤ 5 X 10 ⁷	1 ml
细菌	≤ 2 X 10 ⁹	0.6 ml	≤ 4 X 10 ⁹	1 ml
血液 ²	\	\	0.25 ml	Up to 1 ml

*1: 按照此表中建议的 *RNAex* 用量进行实验需 2 次上柱离心；若样本起始量小于表格中推荐量，为确保裂解充分，建议不改变 *RNAex* 的使用量，按照表格中推荐添加；若样本量加大，建议按比例增加 *RNAex* 用量，多次上柱离心。

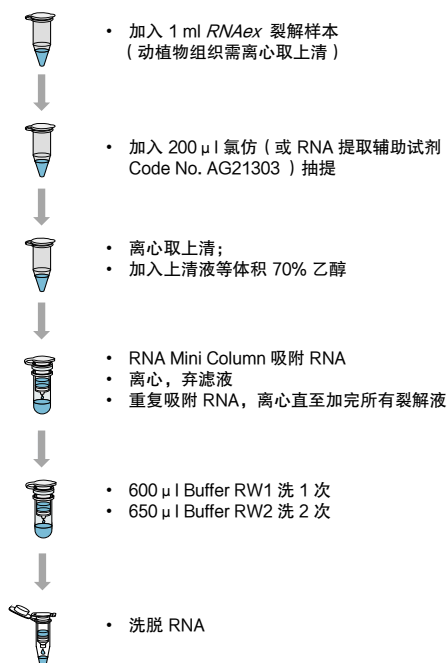
*2: 血液样本建议使用氯仿 (或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303) 抽提方法，若样本起始量小于 0.25 ml，请加入 *RNAex* 至终体积达到 1 ml；若样本起始量大于 0.25 ml，请按照样本起始量 3 倍体积添加 *RNAex*。

➤ 操作流程简图

无氯仿抽提方法



氯仿抽提方法



操作流程

裂解步骤

【此步骤以 *AG RNAex Pro* Reagent (Code No. AG21101 和 AG21102) 为例, 裂解液及样本的加入量可参考上述表格: “Table. 1 不同样本起始量和 *RNAex* 使用量”】。

◆ 贴壁培养细胞

1. 吸出培养液, 用 1X PBS 清洗细胞一次。
2. 吸出 PBS 洗液, 然后向培养细胞中加入适量的 *RNAex*, 轻摇培养皿, 确保 *RNAex* 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。)
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, 再用移液器吹打直至裂解液中无明显沉淀 (溶液清亮)。
4. 室温静置 5 分钟后, 再进行后续的 RNA 纯化步骤。



样本的裂解处理

◆ 悬浮培养细胞

1. 收集适量的悬浮细胞至离心管中, 8,000 g 室温离心 2 分钟, 弃上清。
2. 加入适量的 *RNAex* 至细胞沉淀中。
3. 用移液器吹打直至裂解液清亮无明显沉淀。
4. 室温静置 5 分钟后, 再进行后续的 RNA 纯化步骤。

◆ 动物组织、植物组织、酵母样品

1. 将准确称量的样品加入至液氮预冷的研钵中, 用研杵研磨组织 (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, 然后向粉末中加入适量的 *RNAex* 并混匀。(针对柔软易裂解的组织样本, 也可以使用匀浆器加入适量 *RNAex* 进行匀浆裂解。)
2. 将上述混合液转移至离心管中, 用移液器反复吹打充分混匀。室温静置 5 分钟, 12,000g 4°C 离心 5 分钟。
3. 小心吸取上清液, 移入新的离心管中, 再进行后续的 RNA 纯化步骤。

◆ 细菌

1. 收集适量的细菌至离心管中, 12,000 rpm 室温离心 2 分钟, 弃上清。
2. 溶菌酶消化步骤: 此步骤为可选步骤, 如果对收量有更高要求, 可进行此步骤, 按照附录“**可选步骤 1**”进行。如不需要, 请按照下述步骤 3 继续进行。(革兰氏阴性菌不加溶菌酶也可提取 RNA, 加入溶菌酶后可获得更高的收量; 革兰氏阳性菌建议进行溶菌酶消化。)
3. 加入适量的 *RNAex*, 用移液枪上下反复吸打直至菌体完全裂解。
4. 室温静置 5 分钟后, 再进行后续的 RNA 纯化步骤。

◆ 血液样本 (采用氯仿抽提步骤)

1. 取新鲜血液或冻存血液至离心管中, 迅速向血液中添加 *RNAex* (血液用量可参考上述表格“Table. 1 不同样本起始量和 *RNAex* 使用量”进行调整)。
2. 用移液枪上下反复吸打直至细胞完全裂解, 室温静置 5 分钟后, 再进行后续的 RNA 纯化步骤。

纯化步骤

1. 选择下述步骤之一进行纯化 (两种方案均可有效去除基因组 DNA 和蛋白质, 如果对 gDNA 去除效果有更高要求, 还可以在后续步骤中进行 DNase I 消化处理):
 - ① 无氯仿抽提方法: 向上述裂解液中加入与裂解液等体积的 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, 后续进行纯化步骤 2。
 - ② 氯仿抽提方法:
 - a) 向上述裂解液中加入 200 μ l 的氯仿或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303 (裂解液体积的 1/5), 充分混合。室温静置 5 分钟。【此处裂解液体积指加入样本后的总体积, 如果是血液样本, 裂解液体积指“血液与 *RNAex* 的总体积”。】

操作流程

- b) 12,000 g 4°C 离心15 分钟。小心取出离心管，此时匀浆液分为三层：上清液（含 RNA）、中间蛋白层及下层有机相。
- c) 吸取上清液转移至另一新的离心管中（切勿吸出中间蛋白层）。向上清液中加入等体积的 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。后续进行纯化步骤 2。
2. 立即将上述混合液全部转移至 RNA Mini Column 中，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
3. 向 RNA Mini Column 中加入 600 μl 的 Buffer RW1，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
4. 向 RNA Mini Column 中加入 650 μl 的 Buffer RW2，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。（注：请确认 Buffer RW2 中已经加入了指定体积的 100% 乙醇）。
5. DNA 酶消化步骤：此步骤为可选步骤，如果对 gDNA 去除效果有更高要求，可进行此步骤，按照附录“**可选步骤 2**”进行。如不需要，请按照下述步骤 6 继续进行。
6. 向 RNA Mini Column 中加入 650 μl 的 Buffer RW2，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
7. 将 RNA Mini Column 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）。
8. 将 RNA Mini Column 安置于新的 RNase Free Tube 上，在 RNA Mini Column 膜的中央处加入 50 μl ~ 200 μl 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，溶解后的 RNA 可直接使用或放入 -80°C 中保存。



RNA Mini Column 吸附 RNA
600 μl Buffer RW1 洗 1 次
650 μl Buffer RW2 洗 2 次



50 μl ~ 200 μl
RNase Free Water 洗脱

附录

可选步骤 1：溶菌酶消化

1. 向菌体沉淀中加入适量的 Lysozyme，用移液器反复吹打充分混匀悬浮菌体。（建议 $\leq 2 \times 10^9$ 个细菌样本中加入 100 μl 0.5 mg / ml 的 Lysozyme，若细菌量增大需按比例增加 Lysozyme 的体积。）
2. 37°C 水浴加热 10 分钟（难以裂解的细菌可延长加热时间至 30 分钟）。
3. 12,000 rpm 室温离心 2 分钟，去上清。
4. 后续实验步骤请按照：裂解步骤中细菌裂解步骤的 3 ~ 4 进行。

可选步骤 2：DNase I 消化【可选择公司产品 DNase I (RNase Free) (Code No. AG12001)】：

1. 按下表配制 DNase I 反应液并混匀。

成分	用量
DNase I (RNase Free)	4 μl
10 × DNase I Buffer	5 μl
RNase free water	41 μl

2. 把 50 μl DNase I 反应液加到 RNA Mini Column 的膜中央，室温静置 15 分钟。
3. 向上述 RNA Mini Column 膜中央加入 350 μl Buffer RW2，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
4. 后续 RNA 纯化，请按照上述纯化步骤 6 ~ 8 进行。