

SteadyPure RNA 提取试剂盒

SteadyPure RNA Extraction Kit

Code No. AG21024

包装量: 50 rxns

保存温度: Package 2-1 4°C

Package 2-2 室温(15 ~ 30°C)

产品概述

本产品将 *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混合液转移至 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。

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 *AG RNAex Pro* Reagent、Buffer RW1、Buffer RW2 不小心溅出,请立刻用清水冲洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

产品组成^{*1}

<i>AG RNAex Pro</i> Reagent	50 ml
Buffer RW1	30 ml
Buffer RW2 ^{*2}	27 ml
RNase Free Water ^{*3}	13 ml
RNA Mini Columns	50 sets
Collection tubes	50 pcs
RNase Free Tubes ^{*4}	50 pcs

*1: *AG RNAex Pro* Reagent 包装于 Package 2-1 中,需放置于 4°C 避光保存,本说明书中“RNAex”也指代此组分;其余组分均包装于 Package 2-2 中,室温(15 ~ 30°C)保存。

*2: Buffer RW2 在首次使用前,请添加 63 ml 的无水乙醇(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。

*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、氯仿(或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303)(可选)、1.5 ml 离心管(RNase free)。
2. Buffer RW2 在首次使用前,请添加 63 ml 的无水乙醇(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: Package 2-1 4°C 避光保存

Package 2-2 室温(15-30°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 *AG RNAex Pro* Reagent 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。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 AG RNAex Pro Reagent 使用量)。如果样本量过大, 请增加 AG RNAex Pro Reagent 的用量。

Table. 1 不同样本起始量和 AG RNAex Pro Reagent 使用量

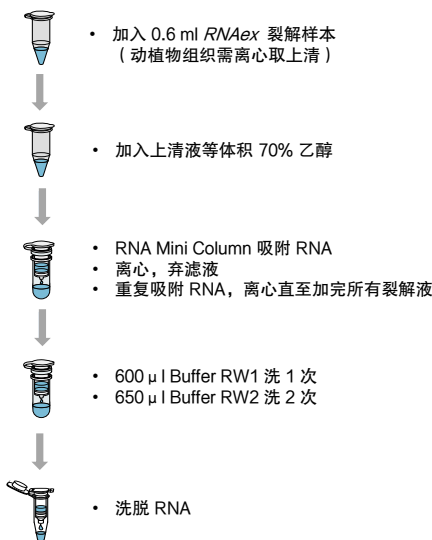
样本名称	无氯仿抽提		氯仿抽提	
	样本起始量	RNAex 使用量*1	样本起始量	RNAex 使用量*1
贴壁培养细胞	$\leq 1 \times 10^7$	0.6 ml	$\leq 2 \times 10^7$	1 ml
悬浮培养细胞	$\leq 1 \times 10^7$	0.6 ml	$\leq 2 \times 10^7$	1 ml
动物组织	≤ 30 mg	0.6 ml	≤ 50 mg	1 ml
植物组织	≤ 60 mg	0.6 ml	≤ 100 mg	1 ml
酵母细胞	$\leq 3 \times 10^7$	0.6 ml	$\leq 5 \times 10^7$	1 ml
细菌	$\leq 2 \times 10^9$	0.6 ml	$\leq 4 \times 10^9$	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。

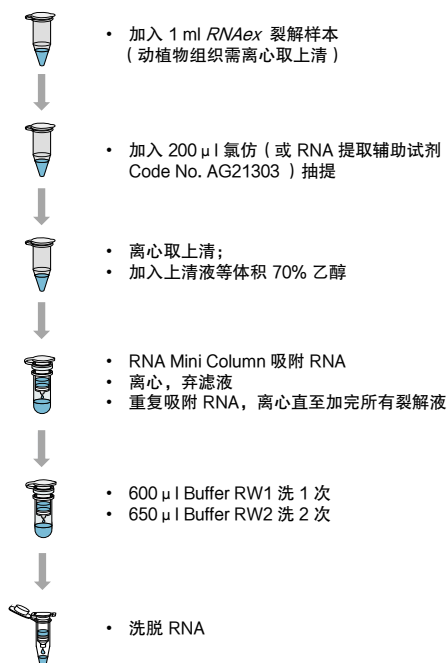
*2: 血液样本建议使用氯仿 (或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303) 抽提方法, 若样本起始量小于 0.25 ml, 请加入 RNAex 至终体积达到 1 ml; 若样本起始量大于 0.25 ml, 请按照样本起始量 3 倍体积添加 RNAex。

➤ 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

◆ 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 *AG RNAex Pro Reagent*，轻摇培养皿，确保 *AG RNAex Pro Reagent* 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 *AG RNAex Pro Reagent* 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 *AG RNAex Pro Reagent* 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 *AG RNAex Pro Reagent* 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 *AG RNAex Pro Reagent*，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 *AG RNAex Pro Reagent*（血液用量可参考上述表格“Table. 1 不同样本起始量和 *AG RNAex Pro Reagent* 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) 向上述裂解匀浆液中加入 200 μ l 的氯仿或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303（裂解匀浆液总体积的 1/5），充分混合。室温静置 5 分钟。【此处裂解匀浆液体积指加入样本后的总体积，如果是血液样本，裂解匀浆液体积指“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无水乙醇）。
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
10X 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。