

SteadyPure 微量组织细胞RNA提取试剂盒

SteadyPure Tissue & Cell RNA Extraction Micro Kit

Code No. AG21035

包装量: 50 rxns
保存温度: Package 2-1 -20°C
 Package 2-2 室温 (15~30°C)

产品概述

本产品适用于从微量的组织样本 (≤5 mg 组织样本, 如显微激光切割样本、穿刺样本等) 和细胞样本 (≤5 × 10⁵ 个细胞, 低至 10 个细胞, 如流式分选的细胞等) 中提取 RNA。采用独特的裂解液可提高 RNA 和硅基质膜的选择性结合能力, 同时灭活 RNA 分解酶。RNA 提取过程中还加入了 Carrier RNA, 可保护提取过程中 RNA 不被降解。同时搭配 gDNA Eraser Mini Columns 和 DNase I, 可去除微量 DNA 杂质, 获得高纯度、高收量的 RNA, 可直接用于 RT-PCR、RT-qPCR、Northern 印迹、NGS 文库构建等分子生物学实验。

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。】

如果缓冲液 Buffer RLS、Buffer RWA 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}

Carrier RNA (100ng/μl)	100 μl X 3 pcs
DNase I (RNase free)	200 μl
10X DNase I Buffer	1 ml
50X DTT Solution	350 μl
Buffer RLS	22 ml
Buffer RWA	35 ml
Buffer RWB ^{*2}	18 ml
RNase Free Water ^{*3}	5 ml
gDNA Eraser Mini Columns	50 sets
RNA Micro Columns	50 sets
Collection tubes	50 pcs
RNase Free Tubes ^{*4}	50 pcs

*1: Carrier RNA (100ng/μl)、DNase I (RNase free)、10X DNase I Buffer 及 50X DTT Solution 包装于 Package 2-1 中, 需放置于 -20°C 保存, 其中 Carrier RNA (100ng/μl) 也可 -80°C 长期保存, 且避免反复冻融; 其余组分均包装于 Package 2-2 中, 室温 (15~30°C) 保存。

*2: Buffer RWB 在首次使用前, 请添加 42 ml 的无水乙醇 (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: RNase Free Water 开启后建议 -20 °C 保存。

*4: RNase Free Tubes 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、1X PBS (RNase free)、1.5 ml 离心管 (RNase free)。
2. Buffer RLS 若出现沉淀, 请于 37°C 加热溶解, 待溶液恢复至室温后使用。
3. 样本裂解液的配制: 向 Buffer RLS 中加入 50X DTT Solution, 至终浓度为 1X DTT Solution, 即每 1 ml 的 Buffer RLS 中加入 20 μl 的 50X DTT Solution。此样本裂解液最好现用现配。加入 50X DTT Solution 的样本裂解液可在 4°C 放置 1 个月。
4. Buffer RWB 在首次使用前, 请添加 42 ml 的无水乙醇 (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。

➤ 保存及运输

保存温度: Package 2-1 -20°C 保存

Package 2-2 室温 (15-30°C) 保存

运输温度: Package 2-1 -20°C 冰袋运输或干冰运输

Package 2-2 室温 (15-30°C) 运输

➤ 注意事项

1. 应尽量使用新鲜的实验材料进行 RNA 提取，实验材料处理过程中（例如样品的微切割及固定等）也需确保 RNA 不被降解。
2. 样本的充分裂解是 RNA 提取的重要步骤，如果样本裂解不充分可能导致 *RNA* Micro Columns 堵塞，从而影响 RNA 纯度及收量。
3. 纤维组织（例如肌肉、心脏、皮肤等）含有大量的连接组织和收缩蛋白，提取过程中需加入蛋白酶 K 进行消化，才能使 RNA 的提取顺利进行，否则可能导致 *RNA* Micro Columns 堵塞，从而影响 RNA 纯度及收量。
4. 样本切勿超过最大上样量（ ≤ 5 mg 组织样本、 $\leq 5 \times 10^5$ 个细胞，此时样本裂解液的用量为 350 μ l），且要裂解充分，避免堵塞 *RNA* Micro Columns，影响 RNA 收量及纯度。如果样本量较大（例如 5-10 mg 的组织样本、 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞），可将样本裂解液的用量增加至 700 μ l，样本充分裂解后，分两个 *RNA* Micro Columns 进行纯化；如果提取的组织样本量 > 10 mg，细胞量 $> 1 \times 10^6$ 个细胞，可选择本公司产品 **SteadyPure 通用型 RNA 提取试剂盒 (Code No. AG21017)** 进行 RNA 提取。
5. Carrier RNA 的使用：
 - a. 当处理 < 10 μ g 组织或 < 5000 个细胞时，可将试剂盒中提供的 Carrier RNA 加入样本裂解液中，实验证明，Carrier RNA 的加入可提高 RNA 的得率，且不会影响后续实验。
 - b. Carrier RNA 工作溶液（浓度为 4 ng/ μ l）的配制：
 - a) 10 倍稀释：取 5 μ l Carrier RNA 加入至 45 μ l Buffer RLS 中，用移液枪吹打混匀；
 - b) 2.5 倍稀释：取上述混匀后的溶液 10 μ l 加入至 15 μ l Buffer RLS 中，此时 Carrier RNA 终浓度为 4 ng/ μ l；
 - c) 此溶液最好现配现用，配制完成后冰上放置待用。
6. 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 提取专用实验服，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. 确保配制好的 70% 乙醇无核酸酶污染。

➤ 操作流程

样本处理步骤

根据样本的不同，选择合适的样本处理步骤，待“样本处理步骤”完成后，请立即进入后续纯化步骤。



样本处理步骤

◆ 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 $\leq 5 \times 10^5$ 个培养细胞（以 293T 细胞为例，12 孔细胞培养板中长满细胞约含有 5×10^5 个培养细胞）中加入 350 μ l 的样本裂解液，轻摇培养皿，确保样本裂解液均匀分布于细胞表面。
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 1.5 ml 离心管中，使用振荡混匀仪高速振荡混匀 5 min 至裂解液呈清亮无明显沉淀，立即进行后续的 RNA 纯化步骤。

【注①】 对于贴壁牢固的培养细胞可用细胞刮勺剥离细胞，获得的细胞收集于 1.5 ml 离心管中，使用振荡混匀仪高速振荡混匀 5 min 至裂解液呈清亮无明显沉淀。

②：应尽可能去除 PBS 洗液，若去除不彻底将会稀释裂解液，导致裂解不充分，影响 RNA 收量。

③：如果细胞提取量 < 5000 时，需要向样本裂解液中加入 20 ng Carrier RNA（5 μ l 浓度为 4 ng/ μ l 的 Carrier RNA 溶液），Carrier RNA 溶液的配制请参见注意事项 5】。

◆ 悬浮培养细胞

1. 收集 $\leq 5 \times 10^5$ 个悬浮细胞至 1.5 ml 离心管中, 8,000 \times g 室温离心 2 min, 弃上清。
2. 加入 350 μ l 样本裂解液至细胞沉淀中。
3. 使用振荡混匀仪高速振荡混匀 5 min 至裂解液呈清亮无明显沉淀, 立即进行后续的纯化步骤。

【注①】: 应尽可能去除细胞培养上清液, 若去除不彻底将会稀释裂解液, 导致裂解不充分, 影响 RNA 收量。

②: 如果细胞提取量 < 5000 时, 需要向样本裂解液中加入 20 ng Carrier RNA (5 μ l 浓度为 4 ng/ μ l 的 Carrier RNA 溶液), Carrier RNA 溶液的配制请参见注意事项 5】。



样本处理步骤

◆ 动物组织样本

以下样本处理步骤适用于从大多数动物组织样本中提取 RNA, 如果要从纤维组织 (例如肌肉、心脏、皮肤等) 中提取 RNA, 请参考以下“纤维组织样本”处理步骤。

1. 将 ≤ 5 mg 的组织样品加入至含有 350 μ l 样本裂解液 (使用前加入 50X DTT Solution, 至终浓度为 1X) 的 1.5 ml 离心管中。
2. 使用研磨杵【可选择公司产品一次性组织研磨杵 (无 DNA 酶、无 RNA 酶) Code No. AG21304】碾压组织样本进行研磨, 直至裂解液中无明显块状物质。

【注】: 如果组织提取量 $< 10 \mu$ g 时, 需要向样本裂解液中加入 20 ng Carrier RNA (5 μ l 浓度为 4 ng/ μ l 的 Carrier RNA 溶液), Carrier RNA 溶液的配制请参见注意事项 5】。

3. 使用振荡混匀仪高速振荡混匀 5 min 至裂解液呈清亮无明显沉淀, 立即进行后续的纯化步骤。

【注】: 样本裂解不充分会导致 RNA Micro Columns 堵塞, 影响 RNA 的纯度及收量降低。若研磨后裂解液中存在明显的块状物质, 可 12,000 rpm 室温离心 3 min, 转移上层溶液于新的 1.5 ml 离心管中, 避免接触到下层沉淀】。

◆ 纤维组织样本

纤维组织 (例如肌肉、心脏、皮肤等) 含有大量的连接组织和收缩蛋白, 提取过程中需加入蛋白酶 K 进行消化, 才能使 RNA 的提取顺利进行, 否则可能导致 RNA Micro Columns 堵塞, 从而影响 RNA 纯度及收量。蛋白酶 K 可选择公司产品【蛋白酶 K Code No. AG12004】

1. 将 ≤ 5 mg 的纤维组织样品加入至 150 μ l 样本裂解液的 1.5 ml 离心管中。
2. 使用研磨杵【可选择公司产品一次性组织研磨杵 (无 DNA 酶、无 RNA 酶) Code No. AG21304】碾压组织样本进行研磨, 直至裂解液中无明显块状物质。

【注】: 如果组织提取量 $< 10 \mu$ g 时, 需要向样本裂解液中加入 20 ng Carrier RNA (5 μ l 浓度为 4 ng/ μ l 的 Carrier RNA 溶液), Carrier RNA 溶液的配制请参见注意事项 5】。

3. 向上述溶液中加入 295 μ l 的 RNase Free Water、5 μ l 的 Proteinase K (20 mg/ml), 用移液枪反复吹打, 使样本充分混匀。
4. 于 56°C 水浴加热 10min, 期间可多次颠倒混匀, 以促进裂解。

【注】: 样本裂解不充分会导致 RNA Micro Columns 堵塞, 影响 RNA 的纯度及收量降低】。

5. 12,000 rpm 室温离心 3 min, 转移上层溶液于新的 1.5 ml 离心管中, 立即进行后续的纯化步骤。

【注】: 组织碎片可能会形成小球或形成一层薄膜漂浮于溶液上层, 转移上层溶液时应避免接触到组织碎片小球, 且枪头需伸到薄膜下进行吸取, 否则可能会影响 RNA 的纯度及收量】。

纯化步骤

1. 过滤裂解物及 gDNA 去除 (可选择): 将上述处理后的样本溶液转移至 gDNA Eraser Mini Column 中, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 将滤液转移至新的 1.5 ml 离心管中。

【注①: 此步骤的目的是过滤除去未充分裂解的组织碎片及 gDNA, 避免堵塞 *RNA* Micro Column, 利于 RNA 与 *RNA* Micro Column 柱膜的结合, 但可能导致 RNA 的收量略有下降, 如果 *RNA* Micro Column 未堵塞, 可跳过此步骤。

②: 一般情况下, 细胞样本可跳过此步骤直接进行后续纯化步骤, 但如果纯化过程中 *RNA* Micro Column 堵塞, 可尝试进行此步骤。

③: 当处理的组织量 ≥ 1 mg 时, 建议进行此步骤, 可以提升 RNA 纯度, 当处理的组织量 < 1 mg 时, 不建议进行此步骤, 否则可能会影响 RNA 收量。】

2. 向上述离心管中加入与滤液等体积的 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。

【注: 若沉淀不打散会导致 *RNA* Micro Column 堵塞, 影响收量及纯度。】

3. 立即将上述混合液全部转移至 *RNA* Micro Column 中, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。
4. 向 *RNA* Micro Column 中加入 350 μ l 的 Buffer RWA, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。
5. DNA 酶消化步骤:

按下表配制 DNase I 反应液并混匀。将 50 μ l DNase I 反应液加到 *RNA* Micro Column 的膜中央, 室温静置 15 min。

成分	用量
DNase I (RNase free)	4 μ l
10X DNase I Buffer	5 μ l
RNase Free Water	41 μ l

6. 向 *RNA* Micro Column 中加入 350 μ l 的 Buffer RWA, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。
7. 向 *RNA* Micro Column 中加入 500 μ l 的 Buffer RWB, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。

【注: 请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】

8. 重复步骤 7 一次
9. 将 *RNA* Micro Column 安置于新的 2.0 ml Collection Tube 上, 12,000 rpm 室温离心 2 min, 弃滤液。

【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。】

10. 在吸附柱 *RNA* Micro Column 膜的中央处加入 10~30 μ l RNase Free Water, 室温静置 2 min, 然后 12,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱 RNA, 溶解后的 RNA 可直接使用或放入 -80°C 中保存。

【注: 此步骤需竖直将吸附柱取出, 避免吸附柱柱头触碰 RNase Free Tube 管壁。】



过滤裂解物及 gDNA 去除
(可选择)



RNA Micro Column 吸附 RNA



DNA 酶消化



350 μ l Buffer RWA 洗 2 次
500 μ l Buffer RWB 洗 2 次



10~30 μ l RNase Free Water 洗脱