



RNApure Fast Tissue&Cell Kit

组织&细胞RNA快速提取试剂盒

Cat. No. CW0599S

产品简介

本试剂盒采用硅胶柱纯化技术，可从动物组织、细胞中快速提取总RNA。提取过程中无需使用 β -巯基乙醇和酚/氯仿等有毒有害试剂，最快7 min，即可提取得到高质量的RNA。本试剂盒可同时处理大量不同样本，且含有2种提取方案，满足不同需求。提取的总RNA得率高、纯度好、无蛋白质和其他杂质污染，可用于RT-PCR、Real-Time PCR、芯片分析、体外翻译等多种下游实验。

储存条件：所有组分可在干燥、室温（15-30°C）环境稳定保存。

产品内容

Component	CW0599S 50 preps
Buffer RLN	35 mL
Buffer RWA	40 mL
Buffer RW2 (concentrate)	13 mL
RNase-Free Water	10 mL
Proteinase K	550 μ L
gDNA-Filter Columns A with Collection Tubes	50
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes(1.5mL)	50

自备仪器试剂

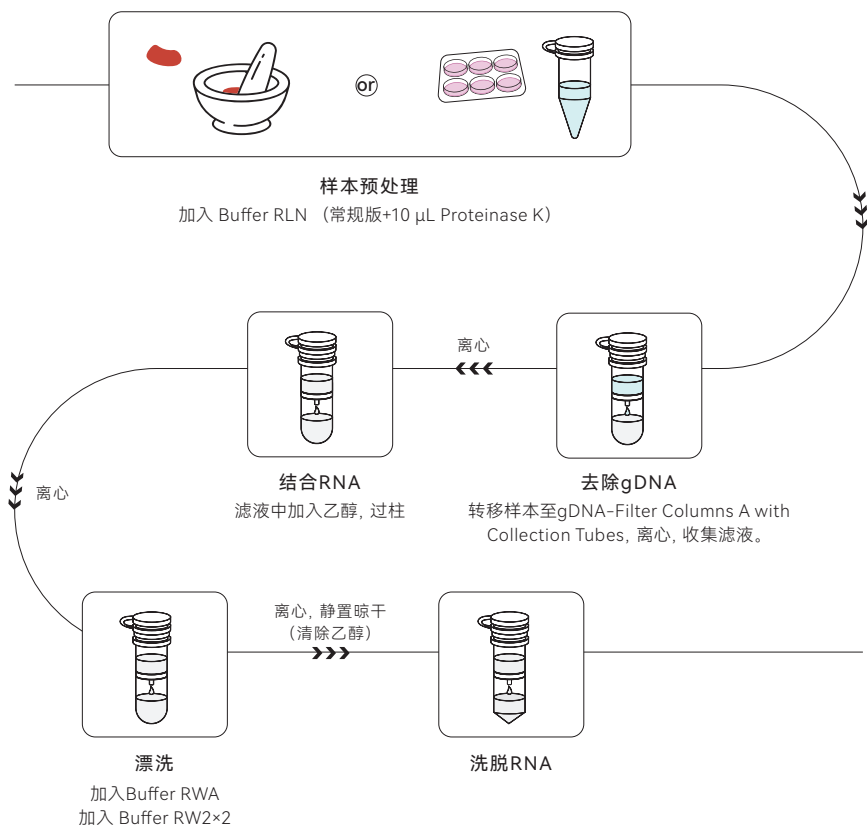
无水乙醇（新开封或提取RNA专用）、RNase-Free 离心管、离心机、RNase-Free枪头、研钵或匀浆器等。

实验前准备及重要注意事项

1. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180°C高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无RNase的水（自备）。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
2. 使用前请检查Buffer RLN是否出现结晶或者沉淀，若出现结晶或者沉淀，可置于56°C加热重新溶解。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer RW2 (concentrate)中加入无水乙醇。
4. 样品处理量请介于10-20 mg组织或者 $<5 \times 10^6$ 个细胞；对于肝脏、脾脏、肾脏等组织，因其DNA与RNA含量丰富，请勿投入超过10 mg，否则会导致提取存在gDNA残留或者RNA产量降低，也可能致使gDNA-Filter Columns A柱堵塞。
5. 提取的样品避免反复冻融，否则影响RNA提取的产量和质量。当使用提取新鲜样本时，若不能及时提取，可将样本立即置于液氮中，速冻，后置于-85~-65°C保存，并避免反复冻融；或将样本立即置于Buffer RLN中匀浆，然后置于-85~-65°C保存。为了避免RNA的降解，应该尽快进行样本的采集与保存。

6. 研磨或者匀浆来破碎样本应彻底，否则容易发生堵塞柱子且会影响RNA的产量；匀浆时尽量控制温度，防止温度过高导致RNA降解的情况。
7. 快速操作中若提取肝脏组织，需用到50%乙醇，请预先用RNase-Free Water（自备）进行配制，且仔细阅读实验流程。
8. 所有的离心步骤若无特殊说明均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。
9. 若下游实验对DNA非常敏感，建议用不含RNase的DNase I（货号CW2090S）对RNA进行处理。

实验流程



操作步骤（快速）

1. 样本处理

1a. 动物组织匀浆处理：取新鲜的组织，每10–20 mg加入500 μ L Buffer RLN（肝组织加入350 μ L Buffer RLN），在冰上用玻璃匀浆器或者电动匀浆器进行匀浆处理，直至无明显组织块即可。

注意：冰上进行匀浆，防止局部温度瞬时升高导致RNA降解。

1b. 动物组织–液氮研磨：将新鲜的组织在液氮中磨碎，将液氮研磨好的组织粉末立刻转移到Buffer RLN中，对于每10–20 mg样本加入500 μ L Buffer RLN（肝组织用350 μ L Buffer RLN），涡旋震荡直至无明显粉末团即可。

注意：匀浆完或者液氮研磨处理后的样本，若不立刻进行提取，可以将样本置于–85~–65°C保存。

1c. 贴壁细胞：无需消化，吸弃细胞培养上清后可直接在培养皿中立即加入Buffer RLN进行消化、裂解操作；或者加入胰酶进行消化后离心收集细胞，然后加入Buffer RLN裂解液，每 $<5 \times 10^6$ 个细胞加入500 μ L Buffer RLN，涡旋震荡直至无明显细胞团即可。

1d. 悬浮细胞：直接离心收集细胞，加入Buffer RLN裂解液，每 $<5 \times 10^6$ 个细胞加入500 μ L Buffer RLN，涡旋震荡直至无明显细胞团即可。

注意：若经过裂解的细胞样本，若不立即进行提取时，可以将样本置于–85 ~ –65°C保存。。

2. 将裂解处理后的样本加入gDNA–Filter Columns A with Collection Tubes中，13,000 rpm (~15,800 \times g)离心1 min，丢弃gDNA–Filter Columns A，**收集滤液**。

3. 向滤液中加入0.5倍体积的无水乙醇（肝组织样本，加入1倍滤液体积的50%乙醇），充分混匀。

注意：加入乙醇后可能会产生沉淀，不会影响后续实验。

4. 将步骤3所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱(Spin Columns RM)中，13,000 rpm (~15,800 \times g)离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

5. 向Spin Columns RM中加入700 μ L Buffer RWA，13,000 rpm (~15,800 \times g)离心30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

6. 向Spin Columns RM中加入**700 μ L Buffer RW2**（使用前检查是否加入无水乙醇），13,000 rpm (~15,800 \times g)离心30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

7. 向Spin Columns RM中加入**500 μ L Buffer RW2**（使用前检查是否加入无水乙醇），13,000 rpm (~15,800 \times g)离心2 min，小心将吸附柱RM从收集管中取出，期间避免接触到滤液，导致污染。

8. （可选）若吸附柱RM存在液体残留或者接触到滤液，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中，13,000 rpm (~15,800 \times g)空离1 min，避免乙醇污染。

9. 将吸附柱置于一个新的RNase-Free离心管中，向吸附柱的中间部位悬空加入30-200 μL RNase-Free Water，室温放置1 min，13,000 rpm ($\sim 15,800 \times g$)离心1 min，收集RNA溶液， $-85 \sim -65^\circ\text{C}$ 保存RNA，防止降解。

注意：1) RNase-Free Water体积不应小于30 μL ，体积过小影响回收率。

2) 如果要提高RNA的产量，可将RNase-Free Water在 65°C 提前预热，滴加至吸附膜中间部位后，室温静置2 - 5 min；或者离心后进行二次洗脱。

操作步骤（常规）

1. 样本前处理

1.1 动物组织：每10-20 mg新鲜的组织加入350 μL Buffer RLN，用电动匀浆器将组织充分匀浆，加入10 μL Proteinase K，涡旋混匀后在室温静置5 min。

注意：对于脾脏组织，建议使用5 mg样本；肌肉类的组织RNA含量较少，可以增加样本量至50 mg-100 mg。

1.2 细胞样本：

1.2.1 收集细胞：

a. 收集悬浮细胞：估计培养的细胞数量，建议不要超过 1×10^7 个细胞，然后 $300 \times g$ 离心5 min，将悬浮细胞收集至离心管中，吸弃培养基上清液。

b. 收集单层贴壁细胞：估计培养的细胞数量，建议不要超过 1×10^7 个细胞，然后按照下述1) 直接裂解或者2) 胰蛋白酶处理（通常采用胰蛋白酶处理在摇瓶中培养的单层贴壁细胞）

1) 直接裂解法：确定细胞数量，彻底吸除细胞培养基上清，立即进行第1.2.2裂解步骤（在容器中直接裂解时，容器直径需小于10 cm）。

2) 胰蛋白酶处理法：确定细胞数量，吸弃培养基，用1*PBS清洗细胞，吸弃PBS，向细胞中加入胰蛋白酶含量为0.10-0.25%的PBS处理细胞，当细胞从容器壁脱离时，加入含有血清的培养基来使胰蛋白酶失活，然后将细胞溶液转移到RNase-Free的离心管中， $300 \times g$ 离心5 min，收集细胞沉淀，吸弃所有上清。

注意：收集细胞时必须要将细胞培养液去除彻底，否则会导致裂解不充分。

1.2.2 裂解处理细胞

对于离心收集到的细胞沉淀：轻弹离心管底部，以使细胞沉淀松散，加入下表中推荐的裂解液Buffer RLN体积和10 μL Proteinase K，涡旋震荡。

细胞数量	Buffer RLN (μL)
$< 5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$	650

对于采用直接裂解的细胞: Buffer RLN体积按照下表加入, 将细胞裂解液转移至离心管中, 涡旋震荡混匀。

容器直径 (cm)	裂解液RLN (μL)
< 6	350
6-10	650

- 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心2-5 min, 取上清进行下步操作。
- 将得到的上清液转移至gDNA-Filter Columns A with Collection Tubes中, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心30 sec, **收集滤液**。
- 向滤液中缓慢加入1倍上清体积的70%乙醇, 混匀, 将得到的溶液和沉淀全部加入到Spin Columns RM with Collection Tubes中, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

注意: 加入乙醇后可能会产生沉淀, 不会影响后续实验。

- 若不进行DNase I消化处理, 向Spin Columns RM中加入700 μL Buffer RWA, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心30 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中; 若进行DNase I消化, 跳过步骤5, 进行步骤6。
- DNase I 消化 (可选步骤): 若后续实验对RNA纯度要求比较严格或者微量DNA非常敏感, 可以选择性的进行DNase I 消化。

1) 向Spin Columns RM中加入350 μL Buffer RWA, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心30 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。

2) 配制DNase I 混合液: 取52 μL RNase-Free Water, 向其中加入8 μL 10 \times Reaction Buffer 和20 μL DNase I (1 U/ μL), 混匀, 配制成终体积为80 μL 的反应液。

注意: 以上体系为按照我公司产品DNase I (CW2090S) 反应体系进行配置, 应用其他公司产品请参考相应说明书。

3) 向Spin Columns RM中直接加入80 μL 配制好的DNase I反应液, 20-30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15min。

4) 向Spin Columns RM中加入350 μL Buffer RWA, 12,000 rpm离心30 sec, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

- 向Spin Columns RM中加入**500 μL Buffer RW2** (使用前检查是否加入无水乙醇), 室温静置2 min, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

- 重复步骤7。

- 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心2 min, 倒掉收集管中的废液。将Spin Columns RM置于室温放置2 min, 以彻底晾干。

注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR等)。

10. 将吸附柱置于一个新的RNase-Free离心管中, 向吸附柱的中间部位悬空加入30-100 μL RNase-Free Water, 室温放置2 min, 12,000 rpm离心1 min, 收集RNA溶液, $-85 \sim -65^{\circ}\text{C}$ 保存RNA, 防止降解。