

超快速细胞总 RNA 快速提取试剂盒

货号: **HKR06**

【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
超快速细胞总 RNA 快速提取试剂盒	HKR06	50T	18 个月

【产品简介】

本试剂盒是用于从动物组织和细胞样本中经柱式法提取纯化 RNA 的广谱型试剂盒。试剂盒采用了特别的裂解缓冲系统, 无需氯仿等有机试剂抽提, 并分别经过 DNA Eraser Spin Column (去除基因组 DNA) 以及 RNA Spin Column (结合 RNA), 可从 5-20 mg 的动物组织、10⁶-10⁷ 新鲜培养的细胞中快速提取高纯度的 RNA, 整个提取过程仅需 30 min 即可完成。获得的 RNA 可以直接用于 Northern 杂交、斑点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RNA 分解酶的保护分析、RT-PCR、Real Time RT-PCR 和构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

【产品组成】

货号	名称	规格
HKR06A	裂解液	30mL
HKR06B	漂洗液	6mL
HKR06C	无 RNA 酶水	10mL
HKR06D	RNA 吸附柱收集管套装	50 套

【储存与运输】

室温运输；室温保存，有效期 18 个月。

【使用方法】

第一次使用前请先向漂洗液中加入 24mL 无水乙醇。

1. 样本匀浆

(1) 细胞

悬浮细胞

300g 离心 5min 收集悬浮细胞一个无 RNA 酶离心管，完全吸弃上清，留下细胞沉淀，加 450 μ L 裂解液，剧烈振荡 20s，分解裂解。

贴壁细胞

可以直接加入 450 μ L 裂解液，用细胞刮刮取细胞，将解液收集至无 RNA 酶 EP 管中，剧烈振荡 20 s，充分裂解。加裂解液之前不要洗涤细胞以免 mRNA 降解。

2) 动物组织

1. 将新鲜组织(20 ~50 mg)剪切成小碎块,放入无 RNA 酶 EP 管中,加入 3-5 颗无 RNA 的氧化错珠,加入 1 mL 解液,用预冷 4° 的组织研磨仪震荡研磨,直至无肉眼可见的组织沉淀。

2. 液氮研磨:在液氮中研磨组织成细粉后,收集至无 RNA 酶 EP 管中,加 1 mL 裂解液,剧烈振荡 20 s,充分裂解。2. 将匀浆样品在室温 (15-30) 放置 5 分钟,使核酸蛋白复合物完全分离。

3. 可选步骤:如样品中含有较多蛋白质,脂肪,多或胞外物质(肌肉,植物结节部分等)可于 2-8°C, 10000x 离心 10 分钟,取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜,多糖,高分子量 DNA,上清中含有 RNA。处理脂肪组织时,上层有大量油脂应去除。取澄清的匀浆液进行下一步操作。

4. 2-8°C 12000rpm 离心 15 分钟。样品分为三层:底层为有机相,上层为无色水相和一个中间层。RNA 主要在水相中。

5. 把水相转移到 RNA 上层吸附管中(如要分离 DNA 和蛋白质可保留有机相)12000rpm 离心 2min, 弃下层收集管中的液体。

6. 上层吸附管中加入 600 μ L 漂洗液(已加入 24 mL 无水乙醇), 12000rpm 离心 2min, 弃下层收集管中的液体

7. 重复一次步骤 6。

8. 将 RNA 吸附柱放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 3 min, 尽量除去漂洗液以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

9. 将上层吸附管转移至新的无 RNA 酶 EP 管中，打开上层吸附管管盖，室温放置干燥 RNA 沉淀，不要晾得过干，否则不易溶解，大约晾 5-10 分钟。加入 30-100 μ L 无 RNA 酶水，放置 3min 使 RNA 溶解，12000rpm 离心 5min，下层的 EP 管中的液体便是提取好的 RNA。

10. 如果提取的 RNA 浓度较低，将步骤 10 中的 RNA 洗脱液回到上层吸附管中，放置 3min 使 RNA 溶解，12000rpm 离心 5min。

DNA分离

准备试剂：

乙醇 0.1M 柠檬酸钠(含 10%乙醇) 75%乙醇 8mMNaOH

操作步骤：

1. 样品加裂解液分层后，移去上层水相，用乙醇沉淀中间层和有机相中的 DNA。每使用 1ml 总 RNA 提取试剂加 0.3ml 无水乙醇混匀，室温放置 3 分钟，2-8 $^{\circ}$ C 不超过 2000xg 离心 5 分钟。

2. 移去上清，(如需要分离蛋白质，可保留，进一步操作见后)用含 10%乙醇的 0.1M 柠檬酸钠洗涤 DNA 沉淀。每用 1ml 总 RNA 提取试剂加入 1ml 柠檬酸钠，室温放置 30 分钟，2-8 $^{\circ}$ C 2000xg 离心 5 分钟，弃上清，重复一次。

3. 用 75%乙醇再洗一遍 DNA 沉淀，每使用 1ml 总 RNA 提取试剂加入 1.5-2ml 75%乙醇，室温放置 10-20 分钟(不时颠倒混合)2-8 $^{\circ}$ C，2000 \times g 离心 5 分钟，弃上清。

4. 室温放置晾 DNA 5-15 分钟，用 8mMNaOH 溶解 DNA。从 50-70mg 组织或 10⁷ 细胞中分离的 DNA 溶于 300-600 μ L 8mMNaOH，DNA 的浓度通常为 0.2-0.3 μ g。提取的 DNA 沉淀不易溶于水和 Ts 缓冲液中，建议用弱碱溶解，8mMNaOH 的 pH 值为 9，溶解 DNA 后可用 TE，HEPES 调节 pH。从某些样品(尤其是组织)中提取的 DNA 中可能包含一些胶状不溶物可 >12000xg 离心 10 分钟除去。DNA 的定量：取一份溶于 8mMNaOH 的 DNA 加水测 A₂₆₀ 值。一单位 A₂₆₀ 值相当于 50 μ g/m 双 DNA。根据 DNA 产量可估计细胞数，人，大鼠，小鼠 1 \times 10⁶ 二倍体细胞含 DNA 的量分别为 7.1 μ g, 6.5 μ g, 5.8 μ g。预期产量：1mg 组织或 1 \times 10⁶ 细胞提取 DNA 分别为：肝和肾 3-4 μ g，骨骼肌，脑组织，胎盘 2-3 μ g 人，大鼠，小鼠培养细胞 (1 \times 10⁶) 5-7 μ g，成纤维细胞 5-7 μ g。

实验注意：

1. DNA 在中间层和有机相中时可在 2-8C 保存过夜

2. DNA 沉淀在 75%乙醇中 2-8 $^{\circ}$ C 可保存几个月。

3. DNA 在 8mMNaOH 溶液中 4C 可放置过夜，如长期保存需用 HEPES 调节 pH 至 7-8 并且加 EDTA 至 1mM 可置于 -20C 长期保存。

蛋白质的提取

准备试剂：

异丙醇含 0.3M 盐酸胍的 95%乙醇无水乙醇 1%SDS

操作步骤：

1. 取沉淀 DNA 后剩余的上清，用异丙醇沉淀蛋白质。每使用 1ml 总 RNA 提取试剂加 1.5ml 异丙醇，室温放置 10 分钟，2-8C 12000xg 离心 10 分钟弃上清。

2. 用含 0.3M 盐酸胍的 95%乙醇洗涤蛋白质沉淀。每使用 1ml 总 RNA 提取试剂加 2ml 洗涤液，室温放置 20 分钟，2-8°C 10000xg 离心 5 分钟，弃上清，重复两次。用 2ml 无水乙醇同样方法再洗一次
3. 真空抽干蛋白质沉淀 5-10 分钟，用 1%SDS 溶解蛋白质，反复吸打，50°C 温浴使其完全溶解，不溶物 2-8°C 10000xg 离心 10 分钟除去。分离得到的蛋白质样品可用于 Westernblot 或 -5~-20°C 保存备用。

实验注意：

4. 蛋白质沉淀可保存在含 0.3M 盐酸胍的 95%乙醇或无水乙醇中 2-8°C 一个月以上或 -5~-20°C 一年以上。
5. 用 0.1%SDS 在 2-8°C 透析三次，10000xg 离心 10 分钟取上清即可用于 Westernblot。

【注意事项】

1. 本产品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会引起中毒、灼伤及其他身体伤害。使用时应穿戴防护物，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不小心接触到眼睛时，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。
2. 请穿实验服并佩戴一次性手套操作，避免 RNase 污染。
3. 需自备 75%醇 (DEPC 处理水配制) DEPC 处理水。
3. RNA 沉淀在 75%乙醇中，4°C 可保存 1 周，-20°C 可保存 1 年。
4. RNA 半衰期比较短，易降解，建议抽提后尽快进行后续实验。
5. 敬告本产品仅作科研用途，勿用于其他用途。