

Trelief® RNAPrep FastPure Tissue&Cell Kit

RNAPrep FastPure 动物组织/细胞总RNA提取试剂盒(双柱型)

■ 目录号

TSP413

■ 产品简介

本试剂盒可从 ≤ 30 mg动物软组织(肝脏、脾脏、肾脏、脑等)、 $\leq 1 \times 10^7$ 个培养细胞中快速提取总RNA。提取过程中无需使用酚氯仿及 β -巯基乙醇,整个提取过程可在25 min内完成。试剂盒结合DNA过滤技术,可高效地过滤去除基因组DNA,提取的总RNA纯度高,无蛋白和其它杂质的污染,可用于RT-PCR、Northern Blot、Poly A纯化、RNase保护分析和体外翻译等实验。

■ 产品组成

组分	规格(50次)	保存条件以及稳定性
Buffer RLF(裂解液)	50 mL	15~25°C保存1年
Buffer RW1F(去蛋白液)	50 mL	15~25°C保存1年

Buffer RW2(漂洗液)	20 mL	15~25°C保存1年,加入无水乙醇后可储存6个月
RNase-Free ddH ₂ O	10 mL	15~25°C保存1年
Reagent DX(消泡剂)	500 μ L	15~25°C保存1年
RNase-Free FastPure RNA Columns(吸附柱)	50 个	15~25°C保存1年
RNase-Free gDNA Filter Columns(基因组DNA过滤柱)	50 个	15~25°C保存1年
Collection Tubes (2 mL收集管)	100个	15~25°C保存1年

■ 注意事项及准备

• 预防RNase污染,应注意以下方面

- 1) 经常更换新手套。皮肤经常带有细菌、汗液及RNase等,可能导致RNA降解。
- 2) 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
- 3) RNA在Buffer RLF中不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150°C烘烤4 h,塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min,然后用水彻底清洗,再灭菌,即可去除RNase。塑料或玻璃器皿也可通过固相RNase清除剂(目录号:TSP005)浸泡处理以去除RNase。
- 4) 配制溶液应使用RNase-Free ddH₂O(将水加入干净的玻璃瓶中,加DEPC至终浓度为0.1%(V/V),混匀放置过夜后高压灭菌)。

• 使用前应注意以下方面

- 1) (可选)Reagent DX(消泡剂): 每1 mL Buffer RLF加入5 μ L Reagent DX(现用现配), Reagent DX能高效消除匀浆过程产生的泡沫。

- 2) 50%、70%乙醇应使用RNase-Free ddH₂O配制。
- 3) 第一次使用前应在Buffer RW2中加入无水乙醇,加入量请参见瓶上标签。

■ 操作步骤(实验前请先阅读注意事项)

1. 样品准备及消化

1.1 从动物组织中提取总RNA

本产品可处理 ≤ 30 mg动物组织,正确组织取样量是获得理想产量和纯度的关键。肝脏10~20 mg,脾脏/胸胰小于10 mg。初次使用时,推荐动物组织量为10~15 mg,根据结果再调整用量。处理肌纤维样品(肌肉/皮肤/心脏),需另外订购Proteinase K(20 mg/mL)。样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器等工具进行匀浆。

1) 取组织样品,加入500~750 μ L Buffer RLF,用合适工具进行匀浆,室温静置3~5 min。

a. < 10 mg动物组织:加入500 μ L Buffer RLF进行匀浆;

b. 10~30 mg动物组织:加入750 μ L Buffer RLF进行匀浆;

c. ≤ 30 mg难裂解组织(肌肉/皮肤/心脏):加入500-700 μ L Buffer RLF进行匀浆。取500 μ L匀浆液,加入250 μ L RNase-Free ddH₂O和20 μ L Proteinase K(需另外订购),颠倒混匀,55°C孵育15 min。

2) 14,000 \times g离心5 min,按第2步进行操作。

1.2 从培养细胞中提取总RNA

本产品单次可处理 $10^2 \sim 10^7$ 个细胞。初次使用时,建议使用 $2 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞。根据结果再调整细胞量。但不论何种情况,细胞量不要超过 1×10^7 。

1) 加入适量的Buffer RLF至细胞样品中,打散细胞。

a. 悬浮细胞:离心收集细胞,弹打或涡旋松散细胞沉淀,加入适量Buffer RLF,涡旋或用移液枪吹打打散细胞。

< 5 × 10⁶个细胞:加入400 μL Buffer RLF;

≥ 5 × 10⁶个细胞:加入750 μL Buffer RLF。

b. 贴壁细胞:彻底吸弃培养液,向培养瓶或培养皿中加入适量的Buffer RLF。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落,转移至1.5 mL RNase-Free离心管中。

< 6 cm直径的培养皿:加入400 μL Buffer RLF;

6~10 cm直径的培养皿:加入750 μL Buffer RLF。

2) 用注射器或移液枪吹打裂解液5~10次打断DNA,按第2步进行操作。

注:样品量过多,裂解不充分会导致裂解液粘稠,堵塞RNase-Free gDNA Filter Columns(基因组DNA过滤柱),如果裂解液非常粘稠可适当增加裂解液用量。

2. 把基因组DNA过滤柱放在2 mL收集管中,把细胞裂解液或组织上清液转移至过滤柱中,14,000×g离心2 min。

注:组织裂解液需高速离心去除杂质后再过柱,否则细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些样品时,离心后裂解液表面还可能会有一层脂类层,转移上清液尽量不要吸到这些物质。若过滤柱堵塞,可将滤液吸出加入适量裂解液匀浆后再转移至新的过滤柱中。

3. 丢弃过滤柱,加入等倍体积70%乙醇至滤液中,用移液枪吹打3~5次。

注:处理肝脏和脾脏时,用50%乙醇代替70%乙醇可以提高产量。若

想更方便,可以用Buffer RW2代替70%乙醇。

4. 把RNase-Free FastPure RNA Columns(吸附柱)放在2 mL收集管中,转移≤ 750 μL混合液至吸附柱中。12,000×g离心30~60 s,倒掉收集管中的废液,把吸附柱放回收集管中。

5.(可选:混合液超过750 μL)转移剩余的混合液至吸附柱,12,000×g离心30~60 s,倒掉收集管中的废液,把吸附柱放回收集管中。

6. 加入500 μL Buffer RW1F至吸附柱上,12,000×g离心30~60 s,倒掉收集管中的废液,把吸附柱放回收集管中。

注:基因组DNA过滤柱可去除95~99%的DNA污染,若后续实验对RNA纯度要求比较严格,可选择使用DNase I(需另外订购)对膜上残留DNA进行消化。

7. 加入500 μL Buffer RW2至吸附柱中,12,000×g离心30~60 s,倒掉废液,把吸附柱放回收集管中。

8. 重复步骤7。

9. 12,000×g离心2 min,倒掉废液,将吸附柱置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残留的漂洗液。

注:此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除,漂洗液的残留,可能会影响后续的反转录等实验。

10.将吸附柱转移至新的RNase-Free离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加30~100 μL RNase-Free ddH₂O,室温静置2 min,12,000×g离心1 min,得到RNA溶液,将洗脱的RNA溶液置于-83~-78℃保存。

RNA完整性及纯度检测

• **完整性:**通常情况下, RNA可通过普通琼脂糖凝胶电泳检测完整性。如果28S和18S条带明亮、清晰、锐利(条带的边缘清晰),并且28S的亮度在18S条带的两倍以上,我们认为RNA的质量较好,否则表示RNA出现降解。出现弥散片状或条带消失表明RNA严重降解。

• **纯度:**

A_{260}	核酸最大吸收峰
A_{280}	蛋白质最大吸收峰
A_{230}	其他杂质(多糖、胍盐等)吸收峰

当 $1.8 < A_{260}/A_{280} < 2.1$ 时,表明RNA较纯且没有蛋白质污染,当

$A_{260}/A_{280} > 2.2$ 时,表明RNA已水解为单核苷酸。

保存条件

保质期1年,试剂盒各组分保存条件见产品组成。

技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议,欢迎随时与我们联系:

product@tsingke.com.cn。

