

操作手册

尿液 RNA 提取试剂盒

Catalog No. TR138-50 (50 次反应)

TR138-200 (200 次反应)

Highlights

- 每次可从 40ml 以内的尿液提取到游离或总 RNA。
- 提取到的 RNA 不含 DNA,并可应用于 Q-PCR, 高通量测序等实验。
- 此产品仅供科研使用。

产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次	200 次
RNA 裂解液	室温	50 ml	2 X 100 ml
RNA 预洗液	室温	25 ml	100 ml
RNA 洗涤液	室温	24 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	2 X 48 ml
RNase-free H ₂ O	室温	6 ml	30 ml
DNase I	-20°C	250U X 1 管	250U X 4 管
DNA 消化液	室温	4 ml	16 ml
DNA/RNA 保护剂	室温	25 ml	200 个
PK 消化液	室温	5 ml	
蛋白酶 K 套装	-20°C	20mg	20mgx4
3 号柱 G (绿色)	室温	50 个	200 个
3 号柱 Y (黄色)	室温	50 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	400 个

特性:

1. 样品来源: 添加了尿液稳定剂的尿液。
2. 样品范围: 40ml以内的尿液。
3. RNA纯度: 高质量的RNA可应用于高通量测序等敏感的下游实验。

试剂制备

RNA 洗涤液 在使用之前一定要配好, 添加好乙醇后在试剂瓶上做好标记!!!
需要添加 96ml100%的乙醇 (或 104ml95%乙醇) 到 24ml 的 **RNA 洗涤液** 中
需要添加 192 ml 100% ethanol (208 ml 95% ethanol) 到 48ml 的 **RNA 洗涤液** 中
试用装已经添加好无水乙醇, 无需额外添加。

溶解冻干粉状态的**DNase I**需要按照管子上的量添加 RNase-free H₂O

一般250U的DNase I 需要添加275μl的RNase-free H₂O

蛋白酶K使用前需要添加1040 μl蛋白酶K保存液到蛋白酶K 20mg 里。蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml。
混匀之后放在-20℃保存

操作步骤:

从≤40ml 的样品中提取总 RNA

以下操作步骤分 3 个部分

A) 总 RNA 细胞沉淀。 B) 蛋白消化。 C) DNA 纯化。

A) 总 RNA 细胞沉淀。

1. 将 40ml 的尿液转移到合适的离心管内。
2. 添加 70μl 的尿液稳定剂到每 1ml 的样品中，涡旋混匀。（例如 350μl 的尿液稳定剂到 5ml 的尿液样品中）。
添加了稳定剂的尿液可以在室温下最长保存 1 周，需要提取核酸时，将添加了稳定剂的尿液涡旋振荡，混匀。
3. 在 3, 000xg 下离心 15 分钟。

B) 蛋白消化。

5. 去除上清，不要搅动细胞沉淀。
6. 添加≥300μl 的 DNA/RNA 保护剂（2X）。
7. 每 300μl 的 DNA/RNA 保护剂需要添加 30μl PK 消化液，15μl 蛋白酶溶液。
8. 重悬细胞沉淀，涡旋混匀，在 55℃下孵育 30 分钟。
9. 涡旋振荡，全速离心样品富集不溶的物质，将上清转移到一个干净的离心管内。

C) RNA 纯化：以下离心力均在 10,000-16,000 x g 范围内进行。

1. 加入等体积的RNA裂解液到上述上清中，混匀。
2. 将上述混合物放入套在收集管上的3号柱Y(黄色)里，离心1分钟，保存滤出液。
3. 加入等体积(95-100%)的无水乙醇到上一步滤出液中。混匀。

4. 将上述混合物放入套在收集管上的3号柱G（绿色）里，离心1分钟。去除滤出液。

5. 柱上DNase I消化处理（可选）

此步骤主要是为了去除痕量的DNA. a) 添加400μl的RNA洗涤液到3号柱G里，离心1分钟。去除滤出液。

b)对于每一次的样品处理需要制备80μl的DNase I反应液。配比为 DNase I 5μl DNA消化液 75μl

c)直接添加80μl的DNase I反应液到3号柱G上，在室温下（20-30℃）孵育15分钟。

6. 添加400μl的RNA预洗液到3号柱G里，离心1分钟。去除滤出液。

7. 添加700μl的RNA洗涤液到3号柱G里，离心1分钟。去除滤出液。

8. 添加400μl的RNA洗涤液到3号柱G里，离心2分钟以去除残留的乙醇，以免抑制下游反应。

9. 取出3号柱G，放入一个无RNA酶的离心管中，在吸附膜的中间部位加100μl RNase-free water, 室温放置2分钟，离心1分钟洗脱RNA。