

操作手册

微量总 RNA 提取试剂盒

Catalog No. TR150-50 (50 次反应)

TR150-50N (50 次反应不带 DNaseI)

TR150-200 (200 次反应)

TR150-200N (200 次反应不带 DNaseI)

Highlights

- 适用于从细胞，组织，酵母菌，植物或者细菌中提取到总 RNA（含 microRNA）。
- 可从少至 1 个细胞中提取到 microRNA，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	5 ml	20 ml
DNase I	-20°C	250U X 1 管	250U X 4 管
DNA 消化液	室温	4 ml	16 ml
1 号柱	室温	50 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	200 个

特性:

1. 样品来源: 细胞, 组织, 酵母, 植物或者细菌, 兼容各种保护剂。
2. 样品范围: 最多 10^6 细胞或5mg的组织。
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。
4. RNA回收率: 可从15 μ l洗脱体积中回收到10 μ g的RNA.

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
试用装需要按照瓶子上标注的量来添加。

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275 μ l的RNase-free H₂O

操作步骤:

整个操作步骤是由3个步骤组成：(I) 样品裂解匀浆 (II) 样品清理 (III) 样品纯化

(I) 样品裂解匀浆

a. 组织

5mg以内的组织加300 μ l的RNA裂解液后匀浆。

b. 单层生长的细胞

去除液体培养基后，直接往培养板中加入RNA裂解液溶解细胞，并用移液枪轻轻吹打混匀。依据细胞的数量来决定所需的RNA裂解液量（ 10^5 细胞以内加100 μ l, 10^6 细胞加300 μ l）。

c. 悬浮生长的细胞

离心沉淀细胞($\leq 500 \times g$)，完全去除上清后用RNA裂解液重悬细胞沉淀。可短暂涡旋振荡。

d. 其他组织:

其他难裂解的组织，酵母，植物匀浆需要配合蛋白酶K和裂解珠（选配）。

e. DNA/RNA保护剂中的组织

将添加了DNA/RNA保护剂的匀浆样品放到室温下，添加1体积的RNA裂解，混匀，然后进行样品纯化步骤。

(II) 样品清理：此步骤主要是针对动植物组织和细胞，对于样品量很低(细胞数 $\leq 10^5$)则无需此步。

将上述匀浆裂解物在离心力 $\geq 12,000 \times g$ 下离心1分钟，将上清移至1.5ml离心管中。

(III) 样品纯化：以下离心力均在10,000-16,000 $\times g$ 范围内进行。

1. 加入等体积(95-100%)的无水乙醇到上一步含有RNA裂解液的上清中混匀。
2. 将上述混合物放入套在收集管上的1号柱子里，离心1分钟。去除滤出液。
3. 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400 μ l的RNA洗涤液到1号柱子里，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40 μ l的DNase I反应液。配比为 DNase I 5 μ l DNA消化液 35 μ l

c) 直接添加40 μ l的DNase I反应液到1号柱上，在室温下（20-30 $^{\circ}$ C）孵育15分钟。

4. 添加400 μ l的RNA预洗液到1号柱子里，离心1分钟。去除滤出液。
5. 添加700 μ l的RNA洗涤液到1号柱子里，离心1分钟。去除滤出液。
6. 添加400 μ l的RNA洗涤液到1号柱子里，离心2分钟。去除滤出液。
7. 空转2分钟以去除残留的乙醇，以免抑制下游反应。
8. 取出1号柱，放入一个无RNA酶的离心管中，在吸附膜的中间部位加15 μ l RNase-free water（事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好），室温放置2分钟，离心1分钟洗脱RNA。