

超微量 RNA 快速提取试剂盒

KR013 50 次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次
裂解液 RLT	室温	20 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前加入 42ml 无水乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
PLANTaid	室温	5 ml
DNase Buffer	-20°C	1.25 ml
RNase free DNase I	-20°C	100 μl
RNase-free 微量 RNA 离心柱和收集管	室温	50 套
Carrier RNA(1μg/μl)	-20°C	500μl

本试剂盒在所需温度储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 低温 (4°C 或者 -20°C) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果, 试剂盒运输和储存均在室温下 (15°C - 25°C)。
2. 长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

产品介绍:

本品为超微量 RNA 提取的专用试剂盒。适用于从超微量的细胞、组织、昆虫、植物、细菌等样品中提取总 RNA。处理范围一般为细胞 (1-10⁶) 或者组织 (< 5mg)。针对痕量样品提取配有 Carrier RNA, 可提高 10 倍核酸的回收效率。配有 DNA 酶柱上消化试剂, 得到的 RNA 无 DNA 残留, 可直接用于下游荧光定量 PCR 或者高通量测序等试验。

注意事项

1. 所有的离心步骤均在室温完成。
2. 植物样品和昆虫类样本, 或者样品量极低的RNA提取, 需要在裂解液RLT中添加PLANTaid和Carrier RNA后提取。具体添加比例为**10体积 (1ml) RLT: (100μl) PLANTaid : (5-10μl)Carrier RNA**。
3. 关于DNA酶柱上消化的使用:
 - 1) 普通RT-PCR: 可以省略DNA酶柱上消化步骤。
 - 2) 反转录试剂盒有去除基因组的, 可以不做DNA酶柱上消化步骤。
 - 3) 反转录试剂盒没有去除基因组的, 必须做DNA酶柱上消化步骤。
 - 4) 高通量测序/转录组测序: 要求特别高的下游实验必须做DNA酶柱上消化步骤。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

- ⇒ 使用前请仔细阅读注意事项。
- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入 42 毫升无水乙醇!

整个操作步骤是由 3 个步骤组成 (所有步骤室温操作):

(一) 样品裂解匀浆

- a. 组织: 5mg 以内的组织加 300μl 的裂解液 RLT 后匀浆。(植物样品和痕量样品需要加 PLANTaid 和 Carrier RNA, 其他不用添加) **注: PLANTaid 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富的困难样品不可缺少成分。Carrier Rna 是提取痕量核酸不可缺少成分。**
- b. 贴壁细胞: 去除液体培养基后, 往培养板中加入裂解液 RLT (痕量样品需加入 PLANTaid 和 Carrier RNA) 溶解细胞, 并用移液枪反复吹打充分裂解混匀。依据细胞的数量来决定所需的裂解液 RLT (10^5 细胞以内加 100μl, 10^6 细胞以内加 300μl)。
- c. 悬浮细胞: 离心沉淀细胞($\leq 500 \times g$), 完全去除上清后用裂解液 RLT (痕量样品需加入 PLANTaid 和 Carrier RNA) 重悬细胞沉淀。可短暂涡旋振荡。
- d. 其它组织: 其他难裂解的组织, 细菌, 酵母, 植物匀浆需配合高速珠磨均质仪器和适合裂解珠 (玻璃珠, 钢珠, 锆珠等)。

(二) 样品清理

若研磨匀浆后不溶物碎片太多, 可将匀浆后裂解物 13, 000rpm 离心 1 分钟沉淀可能存在的裂解困难的

碎片或者不溶物。将上清液转移到新的 1.5ml 离心管内。

注意: 针对痕量样品 (细胞数 $\leq 10^5$) 或者匀浆后能充分裂解均一的样品无需下面离心步骤。

(三) 样品纯化

1. 加入等体积(95-100%)的无水乙醇到上一步的裂解物上清中吹打混匀。
2. 将混合物加入一个微量 RNA 离心柱中, (吸附柱放入收集管中) 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
3. DNA 酶柱上消化 (可选) 具体步骤参考附录 1, 如不需要 DNA 酶柱上消化, 直接进入步骤 4。
4. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
5. 加入 500 μ l 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
6. 重复步骤 5 一次
7. 将离心柱放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 除去漂洗液残留乙醇以免抑制下游反应。
8. 取出离心柱, 放入 1.5ml 离心管(RNA 酶 Free)中, 在吸附膜的中间部位加 15 μ l RNase free water (事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量), 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。离心管中液体为提取 RNA 溶液, 可继续后续实验。

减少洗脱液体积可以提高 RNA 浓度, 但是最低洗脱液体积不应少于 6 μ l。

附录 1: DNA 酶柱上消化

1. 取 20 μ l DNase buffer 和 2 μ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液 (处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液)。

注意: DNase Buffer 含 Mn^{2+} , 可能有轻度发黄发黑, 甚至黑色沉淀为正常现象, 颠倒混匀后正常使用即可。

2. 向离心柱中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
3. 向离心柱的膜中央加入前面准备的 22 μ l 的 DNase I 工作液, 室温 (20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C) 放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上充分浸润膜, 不要让工作液滴在离心柱管壁上挂壁不能充分和膜接触。
4. 向离心柱中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃废液, 将离心柱放回收集管中。
5. 接操作步骤 (三) 样品纯化下面第 5 步, 完成后续步骤。