Version 07/21

Flying Shark® Plus Tissue&Cell RNA Kit (gDNA-Filter)

组织/细胞 RNA 提取试剂盒（gDNA 清除柱）

目录号：RNE12

试剂盒组成

Component	RNE12 (50 preps)
Buffer RL	30 ml
70%乙醇	9 ml （*使用前按瓶上标签加入无水乙醇*）
Buffer RW1	25 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml （*使用前按瓶上标签加入无水乙醇*）
RNase-free H_2O	10 ml
gDNA-Filter Columns with Collection Tubes	50
Spin Columns RA with Collection Tubes	50

保存方法

室温（15-30℃）保存。

产品介绍

独特的裂解液迅速裂解细胞并灭活细胞 RNA 酶，**使用 gDNA-Filter Columns 去除基因组 DNA**，乙醇调节结合条件后，RNA 吸附于硅基质膜上，再通过两步漂洗，将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free H_2O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。提取的 RNA 纯度极高，质量稳定可靠，可直接用于 RT-PCR、芯片分析、分子克隆等多种下游实验。

注意事项

1. 提取的样品避免反复冻融，否则影响 RNA 提取得率和质量。
2. 低温时如果 Buffer RL 产生沉淀，请水浴加热使其溶解后使用。
3. **基因组清除柱 gDNA-Filter Columns 可以去除绝大部分 DNA 污染，纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase 处理即可用于下游操作。**
4. **第一次使用 70%乙醇和 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。**

操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

1. 样本处理

动物组织

a) **电动匀浆**：将新鲜组织迅速剪成小碎块，加入 **350 µl**（**＜20 mg 组织**）或者 **600 µl**（**20 mg-30 mg 组织**）的 Buffer RL，用电动匀浆器迅速彻底匀浆 30 s。

b) **液氮研磨**：液氮中研磨组织成细粉，取 20 mg/30 mg 细粉立即转移至装有 **350 µl/600 µl Buffer RL** 的 1.5 ml 离心管中，反复吸打匀浆（不要有组织团块），涡旋震荡 20 s。

c) 12,000 rpm（~13,400×g）离心 **2 min**，沉淀不能裂解的组织碎片，吸取上清进行步骤 2。

培养细胞

a) 收集＜10^7 悬浮细胞，12,000 rpm 离心 30 s（或者 300 g 离心 5 min），使细胞沉淀下来，吸弃上清，留下细胞团，**充分振荡将细胞沉淀完全松散重悬**。
注意：1）对于单层贴壁细胞，孔板培养细胞可以直接在培养容器中裂解，细胞瓶培养的贴壁细胞通常先用胰蛋白酶消化后离心收集。2）收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净，否则会稀释裂解液导致产量纯度降低。

b) 加入适量裂解液 Buffer RL（见下表），涡旋振荡 20 s 至细胞团溶解消失，充分裂解。
注意：RNA 在 Buffer RL 中不会被 RNase 降解，如果细胞在加入 Buffer RL 裂解后不立即提取，可存放于-80℃一个月以上（注意正确操作是细胞充分裂解之后再冻存）。

细胞数量	培养器皿直径（cm）	Buffer RL 加入量（µl）
＜5×10^6	＜6	350
5×10^6-1×10^7	6-10	600

2. 将上清液或裂解混合物转移到已装入收集管的 gDNA 清除柱（gDNA-Filter Columns）中，12,000 rpm 离心 2 min，弃掉 gDNA-Filter Columns，**保留滤液（RNA 在滤液中）**。

3. 加入**与滤液等体积的 70%乙醇**（通常为 350 µl 或 600 µl，*使用前检查是否加入无水乙醇*），反复吸打充分混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RA）中，若一次不能将全部溶液加入吸附柱中，请分两次转入。12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。

4. 向吸附柱 RA 中加入 **500 µl Buffer RW1**，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

5. 向吸附柱 RA 中加入 **600 µl Buffer RW2**（使用前检查是否加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

6. 重复步骤 5。

7. 将吸附柱放回空收集管内，12,000 rpm 离心 2 min，弃收集管。
注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

8. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 **30-50 µl RNase-Free H_2O**，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液，-70℃保存。
注意：RNase-Free H_2O 体积不应少于 30 µl，体积过小影响回收效率。