

Flying Shark[®] Tissue&Cell Total RNA Kit
组织/细胞总 RNA 提取试剂盒

目录号: **RNE11**

试剂盒组成

Component	RNE11-01 (50 preps)	RNE11-02 (100 preps)
Buffer RL	30 ml	60 ml
70%乙醇	9 ml	18 ml
	(使用前按瓶上标签加入无水乙醇)	
Buffer RW1	25 ml	50 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml	25 ml
	(使用前按瓶上标签加入无水乙醇)	
RNase-free H ₂ O	10 ml	15 ml
Spin Columns RA with Collection Tubes	50	100

保存方法

室温 (15-30°C) 保存。

产品介绍

本试剂盒适用于从动物组织、培养细胞中提取总 RNA, 包括其感染的病毒 RNA。

本产品基于硅胶膜纯化技术, 提取过程中无需使用 β-巯基乙醇和酚/氯仿等有毒有害试剂。独特的裂解液迅速裂解细胞并灭活细胞核酸酶, 再用乙醇调节结合条件后, RNA 在高离序盐状态下特异性吸附于硅基质膜, 再通过漂洗步骤, 将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后 RNase free H₂O 将纯净的 RNA 从硅基质膜上洗脱。

实验前请阅读注意事项

1. 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. 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, 并打钩标记, 以免重复加入。
4. 本试剂盒不包含基因组去除步骤, 提取的总 RNA 可在去除基因组残留(如使用带有 DNA 去除步骤的反转录试剂盒)后用于 RT-qPCR、芯片分析和分子克隆等多种下游实验。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。



操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

1. 样本前处理

动物组织

- a) **匀浆处理**：将新鲜组织迅速剪成小碎块，加入 **350 μ l** (<20 mg 组织) 或者 **600 μ l** (20 mg-30 mg 组织) 的 Buffer RL，推荐电动匀浆器（玻璃匀浆器也可）迅速彻底匀浆 30 s。
(常以组织大小估算鲜重，黄豆粒大小约为 100mg、绿豆粒约 50mg、大米粒约 10mg)

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 μ l/600 μ l** 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。

- b) **12,000 rpm** (~13,400 \times g) 离心 **2 min**，沉淀不能裂解的组织碎片，取上清液进行步骤 2。

培养细胞

- a) 建议收集 <10⁷ 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，弃上清，留下细胞团。

注意：1) 对于单层贴壁细胞、孔板培养细胞可无需消化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，可充分裂解后存放于 -80 $^{\circ}$ C 一个月以上。

细胞数量	培养器皿直径 (cm)	Buffer RL 加入量 (μ l)
<5 \times 10 ⁶	<6	350
5 \times 10 ⁶ -1 \times 10 ⁷	6-10	600

2. 加入与滤液等体积的 **70%乙醇**（通常为 350 μ l 或 600 μ l，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。

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

4. 向吸附柱 RA 中加入 **600 μ l** 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。

5. 重复步骤 4。

6. 将吸附柱放回空收集管内，12,000 rpm 离心 2 min。

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）。

7. 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 μ l** RNase-Free H₂O，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液，-70 $^{\circ}$ C 保存。
注意：RNase-Free H₂O 体积不应少于 30 μ l，体积过小影响回收效率。如果要提高 RNA 浓度，可将得到的 RNA 溶液重新加入到吸附柱中进行二次洗脱。