

Flying Shark<sup>®</sup> Tissue&Cell Total RNA Kit(gDNA-Filter)

## 组织/细胞总 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 <sub>2</sub> O	10 ml
gDNA-Filter Columns with Collection Tubes	50
Spin Columns RA with Collection Tubes	50

### 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，**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<sub>2</sub>O 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。

### 实验前请阅读注意事项

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  $\mu$ l** (<20 mg 组织) 或者 **600  $\mu$ 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  $\mu$ l/600  $\mu$ 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 <10<sup>7</sup> 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 ( $\mu$ l)
<5 $\times$ 10 <sup>6</sup>	<6	350
5 $\times$ 10 <sup>6</sup> -1 $\times$ 10 <sup>7</sup>	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  $\mu$ l 或 600  $\mu$ 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。
4. 向吸附柱 RA 中加入 **500  $\mu$ l Buffer RW1**，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
5. 向吸附柱 RA 中加入 **600  $\mu$ 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。
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**：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  $\mu$ l RNase-Free H<sub>2</sub>O**，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 H<sub>2</sub>O 体积不应少于 30  $\mu$ l，体积过小影响回收效率。