

GNM 双柱法快速纯化总 RNA 提取试剂盒

说明书

货 号:

HCD0733-50



一、试剂盒简介

本试剂盒采用 RLA Solution 裂解液，能快速裂解细胞，释放 RNA 的同时有效灭活 RNase。其特殊的吸附膜设计，大幅提升 RNA 得率，所提 RNA 纯度高、完整性好。适用于多种细胞或组织的 RNA 抽提，可用于 Northern blot、Dot blot、poly A 筛选、体外翻译、RNase 保护分析及分子克隆等实验。

二、试剂盒规格及组分

组分名称	HCD0733-50
裂解液 RLA	30 ml
去蛋白液 RW1	40 ml
洗液 WN	30 ml
漂洗液 RW	12 ml
RNase - Free ddH ₂ O	15 ml
RNase - Free 过滤柱 CS (含 2ml 收集管)	50 套
RNase - Free 吸附柱 CR4 (含 2 ml 收集管)	50 套
RNase - Free 离心管 (1.5 ml)	50 个

三、保存与运输条件

保存条件：试剂盒裂解液 RLA 2~8℃储存，其他所有组分在室温 15~30℃的干燥环境下储存，保质期为 12 个月。

运输条件：试剂盒常温运输。

四、预防 RNase 污染措施

1. 勤换新手套，防止皮肤携带细菌造成 RNase 污染。
2. 使用无 RNase 的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
3. RNA 在裂解液 RLA 中稳定，后续处理需用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿 150℃烘烤 4 小时，塑料器皿用 0.5 M NaOH 浸泡 10 分钟，清洗后灭菌可除 RNase。
4. 配制溶液需用 RNase - Free 水（水加 DEPC 至 0.2% (v/v)，混匀过夜，高压灭菌）。



五、注意事项

1. 若对 RNA 纯度要求高，可选择进行 DNase I 消化（DNase I 需自行购买）。
2. 首次使用前，按去蛋白液 RW1 及 漂洗液 RW 瓶上标签指示加入无水乙醇。
3. 除特殊说明，操作均在室温进行。

六、操作步骤

（一）从动物组织中提取总 RNA

1. **样本前处理：**每 10-20 mg 组织加 350 μ l 裂解液 RLA，电动匀浆器匀浆后，混匀室温放置 5 min。
 脾脏组织建议用 5 mg，肌肉组织可加至 50 - 100 mg。
2. 将裂解液加入过滤柱 CS 柱，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 sec，保留滤液。
3. 滤液中缓慢加入 0.5 倍上清体积的无水乙醇，混匀（可能有沉淀），溶液和沉淀转入 RNase - Free 吸附柱 CR4，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 sec，弃废液，吸附柱放回收集管。
4. 若不进行 DNase I 消化或 DNA 选择性洗脱，向吸附柱 CR4 加 700 μ l 去蛋白液 RW1（使用前检查是否加乙醇），12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 sec，弃废液，吸附柱放回收集管。
5. **DNase I 消化（可选）**
 - 向吸附柱 CR4 加 350 μ l 去蛋白液 RW1，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 sec，弃废液，吸附柱放回收集管。
 - DNase I 反应液配制：将 DNase I 干粉（1500 U）溶于 550 μ l RNase - Free ddH₂O，轻柔混匀，分装后 -30 $\sim$ -15 $^{\circ}$ C 贮存（可保存 9 个月）。融化后的储存液存于 2 - 8 $^{\circ}$ C（可保存 6 周），不可再次冻存。
 - 取 10 μ l DNase I 储存液于新的 RNase - Free 离心管，加 70 μ l 1x DNase I Buffer 溶液，轻柔混匀。
 - 向吸附柱 CR4 中央加 80 μ l DNase I 工作液，室温放置 15 min。
 - 向吸附柱 CR4 加 350 μ l 去蛋白液 RW1 室温放置 2 min，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 sec，弃废液，吸附柱放回收集管。
6. **DNA 选择性洗脱（可选）**
 - 向吸附柱 CR4 加 700 μ l 去蛋白液 RW1，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 sec，弃废液，吸附柱放回收集管。



- 向吸附柱 CR4 中央加 500 μ l 洗液 WN, 室温放置 1 min, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 sec, 弃废液, 吸附柱放回收集管。
- 7. 向吸附柱 CR4 加 500 μ l 漂洗液 RW (使用前检查是否加乙醇), 室温静置 2 min, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 - 60 sec, 弃废液, 吸附柱放回收集管。
- 8. 重复步骤 7 一次。
- 9. 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 2 min, 倒掉废液, 吸附柱 CR4 室温放置 2 min, 晾干残余漂洗液 (避免影响后续 RT 等实验)。
- 10. 将吸附柱 CR4 转入新的 RNase - Free 离心管, 向吸附膜中间悬空滴加 50 - 100 μ l RNase - Free ddH₂O, 室温放置 2 min, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 2 min, 得到 RNA 溶液。洗脱缓冲液体积不少于 50 μ l, RNA 溶液于 -70°C 保存。

(二) 从细胞中提取总 RNA

1. 收集细胞

- **悬浮细胞:** 估计细胞数量, 300 $\times g$ 离心 5 min, 收集细胞至离心管, 吸除所有培养基上清。
- **单层贴壁细胞:** 可直接在培养容器中裂解 (容器直径不超 10 cm) 或胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀 (摇瓶培养的单层贴壁细胞常用此方法)。
 - **直接裂解法:** 确定细胞数量, 吸除培养基上清后直接进行裂解步骤。
 - **胰蛋白酶处理法:** 确定细胞数量, 吸除培养基, PBS 洗涤, 吸除 PBS, 加含 0.10 - 0.25% 胰蛋白酶的 PBS 处理细胞, 细胞脱离容器壁时, 加含血清培养基失活胰蛋白酶, 转移至 RNase - Free 离心管, 300 $\times g$ 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 吸除所有上清。注意收集细胞时要去除干净培养液, 否则影响 RNA 提取。

2. 裂解处理

- 离心得到的细胞沉淀: 轻弹管底使沉淀松散, 按细胞数量加入适量裂解液 RLA ($< 5 \times 10^6$ 个细胞加 350 μ l; $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 个细胞加 600 μ l), 旋涡震荡混匀。
- 直接裂解的细胞: 按容器直径加入裂解液 RLA (直径 < 6 cm 加 350 μ l; 6 - 10 cm 加 600 μ l), 转移至离心管, 涡旋震荡混匀。

3. 后续步骤与动物组织提取总 RNA 的对应 2-10 步骤一致。

(三) 从细菌中提取总 RNA

取适量指数生长期细菌 (最多可达 1×10^9), 5000 rpm 离心 3-5 分钟, 彻底弃掉培养基, 加入 100 μ l 含溶菌酶的 TE Buffer, 振荡混匀。再加入 350 μ l 裂解液 RLA, 剧烈振荡确保细菌充分裂



解。其中，G⁻菌使用的 TE 中溶菌酶浓度为 400μg/ml，室温酶解 3-5 分钟；G⁺菌使用的 TE 中溶菌酶浓度为 3mg/ml，室温酶解 5-10 分钟。

后续步骤与动物组织提取总 RNA 的对应 2-10 步骤一致。

（四）从植物组织和丝状真菌中提取总 RNA

称取不超过 100mg 植物组织、丝状真菌样品，用液氮充分碾磨成粉末状，在液氮挥发完前，将样品转移至 RNase-free 的 1.5ml 离心管中。立即加入 450μl 裂解液 RLA，剧烈振荡混匀。

后续步骤与动物组织提取总 RNA 的对应 2-10 步骤一致。

（五）RNA 完整性及纯度检测

1. **完整性：**用普通琼脂糖凝胶电泳检测（胶浓度 1.2%；0.5×TBE 电泳缓冲液；150V，15 min）。细胞中 70% - 80% 的 RNA 为 rRNA，电泳后 UV 下可见明显 rRNA 条带，28S rRNA 量约为 18S rRNA 的两倍时，RNA 完整性较好。
2. **纯度：**通过 OD260/OD280 比值衡量蛋白质污染程度，高质量 RNA 读数在 1.8 - 2.1 之间，比值为 2.0 是高质量 RNA 的标志。读数受测定溶液 pH 值影响，同一个 RNA 样品，假定在 10 mM Tris，pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280 读数 1.8-2.1 之间，在水溶液中所测 OD260/OD280 读数则可能在 1.5-1.9 之间，但这并不表示 RNA 不纯。

七、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。

