

组织 RNA 小提试剂盒简明说明书 (BW-R6311)

产品简介

本试剂盒提供了一种简便快速的方法，可在 30 分钟内从组织、培养细胞内分离总 RNA。纯化后的 RNA 中只存在微量的基因组 DNA。本试剂盒可从真核细胞或动物组织中提取到至多 100 µg 总 RNA。纯化后的 RNA 可用于 RT-PCR、Northern 杂交、polyA+ RNA 纯化、核酸酶保护和体外翻译。

本试剂盒结合 ezBind RNA 技术的可逆结合特性和特殊的缓冲液，可在 RNA 分离前有效去除基因组 DNA。如有必要，可通过 DNase I 处理来消除微量基因组 DNA（详见操作步骤）。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
DNA Clearance Columns	10	50	250
RNA Mini Columns	10	50	250
2 mL Collection Tubes	20	100	500
Buffer LY	6 mL	28 mL	135 mL
Buffer RB	6 mL	30 mL	135 mL
RNA Wash Buffer*	3 mL	24 mL	3 x 24 mL
DEPC-treated ddH ₂ O	1 mL	10 mL	30 mL
1.5 mL RNase-free Microfuge Tubes	10	50	250
User Manual	1	1	1

要点

- RNA Wash Buffer: 使用前请将 12 mL (BW-R6311-00) 或 96 mL (BW-R6311-01) 或 96 mL (BW-R6311-02) 96-100% 乙醇加入至每个 RNA Wash Buffer 瓶内。
- Buffer LY: 使用前确定 Buffer LY 的用量，在每 1 mL Buffer LY 内加入 20 µL 的β-巯基乙醇，可在室温放置 1 个月。Buffer LY 有可能形成结晶，使用前请于 37°C 溶解。
- 在室温下进行所有操作步骤。尽可能快速操作，减少 RNA 降解。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。所有试剂及用品可保存于室温 (4-28°C)。

实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- β-巯基乙醇
- 小型台式离心机
- 真空负压装置（若使用负压/离心步骤）

组织样品的破坏和匀浆化

为了获得高质量的 RNA，对样品进行完全和适当的破坏和均质化是至关重要的。均质化是为了通过剪切基因组 DNA 和其他高分子量细胞成分来降低粘度。不完全的均质化可能导致柱子堵塞，从而降低 RNA 得率。

1. 样品通过研钵和研杵破坏

- 立即切除组织并冷冻于液氮中
- 在液氮存在下，用陶瓷研钵和研杵将样品研磨成细粉
- 将悬浮液转移至液氮预冷的离心管内，让液氮蒸发，同时样品保持冷冻状态
- 在样品解冻前加入 Buffer LY

2. 使用 homogenization columns 均质化

利用 BEIWO 的 homogenization column 对样品进行均质化是一种快速、有效的方法。每个柱子可以上样 700 µL。Homogenization column (Catalog#R1800) 可从 BEIWO 单独购买。

3. 通过转子-定子对样品破坏和匀浆

使用合适大小的转子和定子，对大部分样品进行破坏和匀浆化。

4. 通过 glass beads 研磨破坏样品和均质化

在 Buffer LY 中加入 glass beads，快速研磨可使细胞和组织被破坏并均质化。动物组织使用 4-8 mm 的 glass beads，酵母细胞使用 0.5 mm 的 glass beads，细菌样品使用 0.1 mm 的 glass beads。

确定样品使用量

得率取决于细胞的量使用和组织的量。请参考表 1 来决定样品使用量并预估得率。

表 1. 典型的 RNA 得率

样品	10 mg/500 μ L Buffer HLY	总RNA得率 (μ g)
肝	10 mg	50 (10 mg组织)
肾	10 mg	20-30 (10 mg组织)
肌肉*	10 mg	20 (10 mg组织)
脾	10 mg	30-40 (10 mg组织)
心脏*	10 mg	50 (10 mg组织)
脑**	10 mg	80 (10 mg组织)
肺	10 mg	10-20 (10 mg组织)
胰腺	10 mg	20 (10 mg组织)
HeLa细胞	1×10^6	15 (1×10^6 细胞)
293HEK	1×10^6	12 (1×10^6 细胞)
COS-7	1×10^6	30 (1×10^6 细胞)
NIH/3T3	1×10^6	10 (1×10^6 细胞)

***注:** 由于富含结缔组织、胶原蛋白和收缩蛋白,使用常规的RNA分离步骤,通常很难从心脏、肌肉、皮肤组织中分离到RNA。通过加入 Proteinase K 优化,使得上述的蛋白被去除。针对心脏、肌肉、皮肤组织,我们建议使用 Biozol RNA 纯化试剂盒 (BW-R7311)。

****注:** 为了从富含脂肪的动物组织中分离RNA,例如胸腺和脑组织,我们建议使用 Biozol RNA 纯化试剂盒 (BW-R7311)。

操作步骤 (从细胞中提取总 RNA)

1. 细胞准备: (不要超过 5×10^6 个细胞)

- **悬浮培养细胞:** 确定细胞数目, 300 \times g离心5 min收集细胞。吸尽所有上清液, 快速进行步骤2。尽量快速操作减少RNA降解。
- **贴壁培养细胞:** 确定细胞数目, 用移液管将培养基完全去除干净, 快速进行步骤2。

注: 上清液必须去除干净, 残留的上清液可能抑制细胞裂解, 从而影响RNA得率。

2. **悬浮培养细胞:** 轻弹管子, 使细胞颗粒松散, 加入**500 μ L Buffer LY**。

贴壁培养细胞: 直接在培养皿内加入**500 μ L Buffer LY**。使用移液管将细胞裂解液混合, 转移至1.5 mL管内。

注: 确定 Buffer LY 的使用量, 每 1 mL Buffer LY 加入 20 μ L 的 β -巯基乙醇。Buffer LY/ β -巯基乙醇混合物可在室温放置 1 个月。

3. 通过大力涡旋或反复吹吸使裂解液, 直至样品完全均质化。

4. 将所有裂解液转移至一个**DNA Clearance Column**。12,000 rpm离心2 min, 丢弃**DNA Clearance Column**, 保留滤液。

注: 该步骤用于去除基因组DNA。

5. 加入1/2体积的100%乙醇至裂解液中 (例如: 250 μ L的100%乙醇加入至500 μ L裂解液中), 用枪头吹打5次以混匀。若有沉淀, 简短地涡旋。

6. 转移上述混合液至一个**RNA Mini Column**, 12,000 rpm离心1 min, 丢弃滤液和收集管, 将**RNA Mini Column**放至一个新的**2 mL Collection Tube**。

7. 加入**500 μ L Buffer RB**, 12,000 rpm离心30 s, 弃滤液。

8. 加入**500 μ L RNA Wash Buffer** (使用前加入乙醇), 12,000 rpm离心30 s, 弃滤液。

9. **可选:** 加入**500 μ L RNA Wash Buffer**, 12,000 rpm离心30 s, 弃滤液和收集管, 将**RNA Mini Column**放至一个新的**2 mL collection tube**, 打开柱子盖子, 12,000 rpm离心1 min。

注: 通过开盖离心可以去除残留的乙醇。

10. 转移**RNA Mini Column**至一个**1.5 mL RNase-free Microfuge Tube**, 加入**50-100 μ L DEPC-treated ddH₂O**至膜中央。12,000 rpm离心1 min洗脱RNA。将RNA溶液储存于-20°C。

操作步骤 (从动物组织中提取总 RNA)

1. 根据表1快速称量合适的组织, 立即转移至含有**500 μ L Buffer LY** (使用前加入 β -巯基乙醇) 的1.5 mL离心管, 冰上操作, 通过转子-定子或超声匀浆器将组织匀浆化。

注: 确定 Buffer LY 的使用量, 每 1 mL Buffer LY 加入 20 μ L 的 β -巯基乙醇。Buffer LY/ β -巯基乙醇混合物可在室温放置 1 个月。**注:** 每个 RNA Column 不要使用超过 30 mg 的组织, 否则会导致基因组污染以及不充分消化。

2. 转移裂解液至一个**DNA Clearance Column** (自带**2 mL Collection Tube**) 12,000 rpm离心2 min, 丢弃**DNA Clearance Column**, 保留滤液。

注: 此步骤用于去除基因组DNA。

3. 加入1/2体积的100%乙醇至裂解液中, (例如250 μ L 100%乙醇加入至500 μ L裂解液中)。

4. 转移上述混合液至一个**RNA Mini Column**, 12,000 rpm离心1 min丢弃滤液和离心管, 将**RNA Mini Column**放入一个新的**2 mL Collection Tube**。

5. 加入**500 μ L Buffer RB**, 12,000 rpm离心30 s, 弃滤液, 将**RNA Mini Column**放回**2 mL Collection Tube**。

6. 加入**500 μ L RNA Wash Buffer**, 12,000 rpm离心1 min, 弃滤液。

7. **可选:** 加入**500 μ L RNA Wash Buffer**, 12,000 rpm离心30 s弃滤液和收集管, 将**RNA Mini Column**放至一个新的**2 mL**

collection tube, 打开柱子盖子。

8. 12,000 rpm离心2 min。此步骤有利于去除残留的乙醇, 提高得率。

9. 转移RNA Mini Column至一个1.5 mL RNase-free Microfuge Tube, 加入50-100 µL DEPC-treated ddH₂O, 12,000 rpm离心1 min。RNA存在于滤液中, 将RNA溶液储存于-20°C。

可选: 使用 DNase I 消化去除基因组 DNA

一些下游实验例如低丰度的靶基因 RT-PCR, 对少量的 DNA 非常敏感, 需要用到 DNase 消化。通常来说, 不需要这样做, 因为本试剂盒已选择性提取 RNA 并去除了绝大部分 DNA。若存在 DNA 污染, 要么减少组织或细胞的使用量。

Catalog#	D001-00	D001-01	D001-02
Preps	4	50	250
DNase I	25 U	260 U	1300 U
1× DNase I Buffer	300 µL	3 mL	15 mL
DNase Stop Buffer	200 µL	2.4 mL	12 mL

*DNase I (Cat#D001)可从 BEIWO 单独购买。

*DNase Stop Buffer 使用前需加入 800 µL (D001-00) 或 9.6 mL (D001-01) 或 48 mL (D001-02) 100%乙醇。终浓度为 80% (v/v)。

操作步骤 (DNase I 消化去除基因组 DNA)

1. 将样品转移至 RNA Mini Column 后, 按下面操作进行 DNase I 消化。

2. 将 RNA Mini Column 置于 2 mL Collection Tube, 加入 500 µL Buffer RB, 按先前的操作步骤离心并弃上清, 重复使用收集管。

3. 加入 50 µL DNase I (2U, RNase-free) 混合液至 RNA Mini Column 膜中央, 室温静置 15 min。加入 200 µL DNase Stop

Buffer, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。加入 300 µL RNA Wash

Buffer, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

常见问题解答

问题	可能原因	建议
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比值低	蛋白污染	使用苯酚: 氯仿萃取, RNA 损失预计在 40% 以内。
	硫氰酸胍污染	加入 2.5 倍体积的乙醇和 0.1 M 的 NaCl (终浓度) 来沉降 RNA, -20°C 孵育 30 min, 4°C, 10,000 ×g 离心 15 min, 用 DEPC-treated ddH ₂ O 重悬 RNA 沉淀。
低得率	样品中 RNA 已降解	采集样品后快速液氮冷冻并储存于 -70°C。
	样品加载量超过了 RNA 柱的最大吸附能力	减少组织样品的加入量。
	乙醇没有加入至 Buffer 中	纯化前在 RNA Wash Buffer 和 DNases Stop Buffer 内按要求加入一定量的乙醇。
基因组 DNA 污染	RT-PCR 加入过量 RNA	减少 RT-PCR 反应时 RNA 的加入量, 控制在 50-100 ng。
	样品富含 DNA	减少样品初始使用量, 30 mg 左右的样品初始使用量大多会出现基因组污染的情况。减少细胞数目至 1-2×10 ⁵ , 增加 buffer 的使用量, 分批多次上几次 RNA 柱子。

杭州倍沃医学科技有限公司

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

market@beiwobiomedical.com