

## 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 Column                        | 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 <sub>2</sub> 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使用量。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 µL Buffer HLY | 总RNA得率 (µg)               |
|---------|-------------------------|---------------------------|
| 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 <sup>6</sup>       | 15 (1×10 <sup>6</sup> 细胞) |
| 293HEK  | 1×10 <sup>6</sup>       | 12 (1×10 <sup>6</sup> 细胞) |
| COS-7   | 1×10 <sup>6</sup>       | 30 (1×10 <sup>6</sup> 细胞) |
| NIH/3T3 | 1×10 <sup>6</sup>       | 10 (1×10 <sup>6</sup> 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<sup>6</sup>个细胞）
- **悬浮培养细胞:** 确定细胞数目, 300 ×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 µL Buffer LY**。

**贴壁培养细胞:** 直接在培养皿内加入**500 µL 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 µL 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 µL的100%乙醇加入至500 µL裂解液中）, 用枪头吹打5次以混匀。若有沉淀, 简短地涡旋。
6. 转移上述混合液只一个**RNA Column**, 12,000 rpm离心1 min, 丢弃滤液和收集管, 将**RNA Column**放至一个新的**2 mL Collection Tube**。
7. 加入**500 µL Buffer RB**, 12,000 rpm离心30 s, 弃滤液。
8. 加入**500 µL 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 µL RNA Wash Buffer**, 12,000 rpm离心30 s, 弃滤液和收集管, 将**RNA 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 Column**至一个**1.5 mL RNase-free Microfuge Tube**, 加入**50-100 µL DEPC-treated ddH<sub>2</sub>O**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 µL 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 µL 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 µL 100%乙醇加入至500 µL裂解液中）。
4. 转移上述混合液至一个**RNA Column**, 12,000 rpm离心1 min 丢弃滤液和离心管, 将**RNA Column**放入一个新的**2 mL Collection Tube**。
5. 加入**500 µL Buffer RB**, 12,000 rpm离心30 s, 弃滤液, 将**RNA Column**放回**2 mL Collection Tube**。
6. 加入**500 µL RNA Wash Buffer**, 12,000 rpm离心1 min, 弃滤液。
7. **可选:** 加入**500 µL RNA Wash Buffer**, 12,000 rpm离心30 s弃滤液和收集管, 将**RNA 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 Column至一个1.5 mL RNase-free Microfuge Tube，加入50-100 µL DEPC-treated ddH<sub>2</sub>O，12,000 rpm离心1 min。RNA存在于滤液中，将RNA溶液储存于-20℃。

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）

- 将样品转移至 RNA Column 后，按下面操作进行 DNase I 消化。
- 将 RNA 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。
- 加入 50 µL DNase I (2U, RNase-free) 混合液至 RNA 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 <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> 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℃ 孵育 30 min，4℃，10,000 ×g 离心 15 min，用 DEPC-treated ddH <sub>2</sub> 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℃。                                                                                                      |
|                                        | 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 <sup>5</sup> ，增加 buffer 的使用量，分批次多上几次 RNA 柱子。                        |

杭州倍沃医学科技有限公司

[www.beiwobiomedical.com](http://www.beiwobiomedical.com)

400-115-2855

[market@beiwobiomedical.com](mailto:market@beiwobiomedical.com)