

For research use only

Version Number: 3.0

Animal Total RNA Isolation Kit

For total RNA purification from animal tissues or cultivated cells

试剂盒组成	RE-03011	RE-03014
	50 T	200 T
Buffer RL1*	25 mL	100 mL
Buffer RL2	15 mL	60 mL
Buffer RW1*	25 mL	100 mL
Buffer RW2	24 mL	96 mL
RNase-Free ddH ₂ O	10 mL	40 mL
RNA-Only Column	50 套	200 套
DNA-Cleaning Column	50 套	200 套
说明书	1 份	1 份

*: Buffer RL1、Buffer RW1 中含有具刺激性的离液盐，操作时请注意佩戴口罩、手套及其他相关防护措施。

产品简介

该试剂盒采用本公司研制的离心柱和配方，可以从各种动物组织中高效率地提取得到高纯度、高质量的总 RNA。试剂盒提供的高效 DNA-Cleaning Column，能轻松的让上清液和组织裂解物分离并吸附除去基因组 DNA，操作简便、省时。

产品应用

该试剂盒适用于多种新鲜或冻存的动物组织或培养细胞总 RNA 提取纯化。

提取得到的总 RNA 可用于各种下游分子实验，例如：cDNA 合成、RT-PCR、Real Time PCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译、芯片分析、PolyA 筛选、分子克隆和 RNase 保护分析等。

储存条件

❖ 本试剂盒在常温(15-25°C)避光干燥条件下，可保存 24 个月。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

❖ 如提取的 RNA 用于克隆全长 cDNA，每 1 mL Buffer RL1 加入 10 μL β-巯基乙醇(建议现配现用)，Buffer RL1 在加入β-巯基乙醇后可在 4°C 放置 1 个月。

如提取的 RNA 仅用于 qPCR 或测序分析等其他下游操作，可以选择不加β-巯基乙醇，不会影响提取效果。

- ❖ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行(包括离心)，切勿使用冰浴和低温(4°C)离心。
- ❖ 样品应尽量选择新鲜样本，冻存样本避免反复冻融，否则会导致提取的 RNA 降解或产量降低。
- ❖ 动物组织单次处理量**请勿超过 20 mg**，培养细胞单次处理量**请勿超过 5 × 10⁶**，否则会影响 RNA 产量和纯度。
- ❖ 试剂盒使用前，请在 **Buffer RL2** 中添加无水乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。
- ❖ 试剂盒使用前，请在 **Buffer RW2** 中添加无水乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。
- ❖ RNA 产率和质量与样本用量及洗脱液体积有关，样本用量请勿超过建议用量；洗脱液体积请勿少于 50 μL，否则会影响 RNA 产量。
- ❖ 请检查试剂盒中的 Buffer RL1 和 Buffer RW1 是否有**晶体析出**现象，若有晶体析出（通常为环境温度过低导致），可将 Buffer 放置于室温或 37°C 一段时间，待晶体溶解后混匀再使用。

材料取用说明

- ❖ 动物组织：单次处理，用量请勿超过 20 mg。
- ❖ 培养细胞：单次处理，用量请勿超过 5 × 10⁶。

操作步骤(全程常温(15-25°C)操作，切勿冰浴和低温离心)

使用前请先在 Buffer RL2 和 Buffer RW2 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

请检查试剂盒中的 Buffer RL1 和 Buffer RW1 是否有**晶体析出**现象，若有**晶体析出（通常为环境温度过低导致）**，可将 Buffer 放置于室温或 37°C 一段时间，待晶体溶解后混匀再使用。

1. 根据样本来源按以下步骤说明进行组织或细胞裂解。
 - a) 动物组织：

匀浆处理：取新鲜组织 **10-20 mg** 加入 **500 μ L Buffer RL1**，用玻璃匀浆器或组织破碎仪将组织研磨均匀。

注意：组织量请勿超过 20 mg，否则 DNA-Cleaning Column 离心时可能会发生堵柱现象，导致 RNA 提取失败。

b) 培养细胞：

1) 贴壁细胞：无需消化，可直接移除培养基后加入 **500 μ L Buffer RL1** 进行消化、裂解；或者使用胰酶消化后离心收集细胞，加入 **500 μ L Buffer RL1**，用移液器反复吹打混匀（直到看不到细胞团为止）。

2) 悬浮细胞：直接离心收集细胞，加入 **500 μ L Buffer RL1**，用移液器反复吹打混匀（直到看不到细胞团为止）。

注意：RNA 在 Buffer RL1 不会受到 RNase 的影响产生降解。如果组织或细胞在加入 Buffer RL1 裂解后不即时使用，在室温条件下可保存约 24 小时，在 4 $^{\circ}$ C 条件下保存约 1 周，更长时间保存请存放于 -80 $^{\circ}$ C，使用时将溶液在室温或 37 $^{\circ}$ C 溶解即可。

2. 将研磨均匀的匀浆液转移至 DNA-Cleaning Column 中(DNA-Cleaning Column 放入收集管中)，12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 **1 min**。移除 DNA-Cleaning Column，保留收集管内上清液。

注意：如果收集管底部有沉淀产生，请将上清液转移至干净离心管中再进行步骤 3，切勿将其吸入上清液中。

3. 向上述上清液(体积应约为 500 μ L)中加入 **1.6 倍体积(800 μ L) Buffer RL2**(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇)，轻柔混匀。

注意：Buffer RL2 加入量请按照实际操作过程中上清液的体积进行比例换算加入。

4. 将 **700 μ L** 混合液转移至 RNA-Only Column 中(RNA-Only Column 放入收集管中)，12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 **10 sec**，弃掉收集管中的废液。

注意：如果混合液中出现絮状沉淀，请将沉淀一并转移至纯化柱中。

5. 将剩余混合液全部加入 RNA-Only Column 中(RNA-Only Column 放入收集管中)，12,000 rpm (~13,400 \times g)，离心 **10 sec**，弃掉收集管中的废液。

6. 向 RNA-Only Column 中(RNA-Only Column 放入收集管中)加入 **500 μ L Buffer RW1**，12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 **10 sec**，弃掉收集管中废液。

7. 向 RNA-Only Column 中(RNA-Only Column 放入收集管中)加入 **700 μ L Buffer RW2**(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 **10 sec**，弃掉收集管中废液。

8. 将 RNA-Only Column 放回收集管中，12,000 rpm (~13,400 \times g) **空管离心 2 min**，弃掉收集管，将 RNA-Only Column 转移至新的离心管中。

9. 向 RNA-Only Column 膜的中央位置滴加 **50-100 μ L** 已于 **65 $^{\circ}$ C** 预热的 **RNase-Free ddH₂O** (切勿将洗脱液添加到压圈上，否则会损失较大体积的洗脱液)，室温放置 **2 min**。12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 **1 min**，收集 RNA 溶液。

注意：RNase-Free ddH₂O 加入体积不应低于 50 μ L，体积过小会影响洗脱效率。

为提高 RNA 产量，可将离心得到的 RNA 溶液重新加至纯化柱中，重复步骤 9。

得到的 RNA 溶液可直接用于下游实验或置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

