

版本号: DP140916

# RNAprep Pure Tissue Kit

## RNAprep Pure

### 动物组织总RNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP431

#### 产品内容

产品组成	DP431 (50 preps)
裂解液RL(Buffer RL)	30 ml
去蛋白液RW1(Buffer RW1)	40 ml
漂洗液RW(Buffer RW)	12 ml
Proteinase K	500 $\mu$ l
研磨杵(Grinding Pestles)	10 个
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O (瓶装)	40 ml
RNase-Free吸附柱CR3 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR3 in a 2 ml Collection Tube)	50 套
DNase I(1500 U)	1 支
缓冲液RDD(Buffer RDD)	4 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O (管装)	1 ml
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5 ml)	50 个

#### 储存条件

RNase-Free DNase I, 缓冲液RDD和RNase-Free ddH<sub>2</sub>O(管装)置于2-8°C保存; 加入 $\beta$ -巯基乙醇的裂解液RL 4°C可放置一个月; 其他试剂室温(15-25°C)保存。

---

## 产品简介

本试剂盒可从动物组织中快速提取总RNA，可同时处理大量不同样品。提取的总RNA纯度高，没有蛋白和其它杂质的污染，可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

## 预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致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RL中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150°C烘烤4 h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(v/v)，混匀后放置过夜，高压灭菌。）

## 使用前注意事项

1. 操作前在RL中加入β-巯基乙醇至终浓度1%，如1 ml RL中加入10 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RL 4°C可放置一个月，裂解液RL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
2. 第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
3. 以下操作如非指明，均在室温下进行。

## DNase I储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550 μl RNase-Free ddH<sub>2</sub>O中，轻柔混匀，分装后-20°C贮存（可保存9个月）。

**注意：从-20°C融化后的DNase I储存液保存于4°C（可保存6周），不要再次冻存。**

---

---

## 操作步骤

### 1. 匀浆处理:

每10-20 mg组织加300  $\mu$ l裂解液RL (使用前请先检查是否已加入 $\beta$ -巯基乙醇)，用研磨杵将组织彻底研磨（如组织较难彻底研磨，可选用电动或玻璃匀浆器）；随后向匀浆液中加入590  $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O和10  $\mu$ l Proteinase K，混匀后56 $^{\circ}$ C处理10-20 min。

**注意：组织量一定不要超过20 mg，否则将导致RNA得率和质量下降。**

### 2. 12,000 rpm(~13,400 $\times$ g)离心2-5 min，取上清进行以下操作。

### 3. 缓慢加入0.5倍上清体积无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中（吸附柱放在收集管中），12,000 rpm(~13,400 $\times$ g)离心30-60 sec，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

### 4. 向吸附柱CR3中加入350 $\mu$ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400 $\times$ g)离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。

### 5. DNase I 工作液的配制：取10 $\mu$ l DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70 $\mu$ l RDD溶液，轻柔混匀。

### 6. 向吸附柱CR3中央加入80 $\mu$ l的DNase I 工作液，室温放置15 min。

### 7. 向吸附柱CR3中加入350 $\mu$ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400 $\times$ g)离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。

### 8. 向吸附柱CR3中加入500 $\mu$ l漂洗液RW (使用前请先检查是否已加入乙醇)，室温静置2 min，12,000 rpm(~13,400 $\times$ g)离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

### 9. 重复步骤8。

### 10. 12,000 rpm(~13,400 $\times$ g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意：此步骤目的是将吸附柱CR3中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的RT等实验。**

---

---

11. 将吸附柱CR3转入一个新的RNase-Free离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100  $\mu\text{l}$  RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，室温放置2 min，12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心2 min，得到RNA溶液。

**注意：**洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu\text{l}$ ，体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

## RNA纯度及浓度检测

**完整性：** RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件：胶浓度1.2%；0.5 $\times$ TBE电泳缓冲液；150V，15 min)检测完整性。由于细胞中70%-80%的RNA为rRNA，电泳后UV下应能看到非常明显的rRNA条带。28S rRNA的量约为18S rRNA的两倍，说明RNA的完整性较好。

**纯度：** OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>读数在1.8-2.1之间，比值为2.0是高质量RNA的标志。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>读数受测定所用溶液的pH值影响。同一个RNA样品，假定在10 mM Tris，pH7.5溶液中测出的OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>读数1.8-2.1之间，在水溶液中所测读数则可能在1.5-1.9之间，但这并不表示RNA不纯。

**浓度：** 取一定量的 RNA 提取物，用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O稀释n 倍，用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O将分光光度计调零，取稀释液进行OD<sub>260</sub>，OD<sub>280</sub>测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times (\text{稀释倍数}n) \times 40$$

---