

动物 RNA 提取试剂盒 (离心柱式, >200 nt)

HX3017

产品简介

动物 RNA 提取试剂盒 (离心柱式, >200 nt) 是一种基于离心柱法从动物组织或培养的动物细胞中安全、快速、便捷、稳定、高效、高质量地提取长度大于 200 个核苷酸 (nucleotide, nt) 的 RNA 的试剂盒。动物组织或细胞中的 RNA 按照长度可以分为长链 RNA (long RNA) 和小 RNA (small RNA), 长链 RNA 通常大于 200 nt, 而小 RNA 通常小于 200 nt。长链 RNA 按照是否编码蛋白或多肽可以分为长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 和 mRNA。本试剂盒使用安全, 通过特殊的柱纯化介质进行 RNA 分离纯化, 能有效避免传统的 Trizol 法提取时使用的酚、氯仿等有毒有害有机试剂; 使用快速、便捷, 采用柱纯化, 无需繁琐的 RNA 沉淀步骤, 提取操作过程仅 15-20 min。相比于传统的 Trizol 提取法, 操作流程显著简化, 缩短了提取时间, 降低了 RNA 被降解的风险; 抽提 RNA 的得率高, 提取效果经反复测试, 100 万个 HeLa 细胞能提取得到约 15-20 μg RNA, 20 mg 小鼠肝组织能提取得到约 25-35 μg RNA, 20 mg 小鼠脑组织中提取得到约 10-20 μg RNA (新鲜样品的得率高于冻存样品)。提取得到的 RNA 的 A260/A280 通常为 2.0-2.2。A260/A230 通常为 1.9-2.1, 纯度高。本产品用于纯化 200 nt 以上的 RNA, 对小于 200 nt 的 small RNA 即小 RNA (如 5.8S rRNA、5S rRNA、tRNA、miRNA、piRNA 等) 被选择性地去除, 适用于新鲜或冻存的动物组织或细胞 RNA 的提取, 推荐的细胞用量为 50-100 万 (上限可达 1000 万), 组织用量为 15-20 mg (上限可达 30 mg)。对于不同的组织或细胞上限会有所差别, 例如小鼠肝脏组织上限可达 30 mg, 但肌肉组织上限为 20 mg。提取获得的大于 200 个核苷酸的 RNA 可以用于各种常规用途, 可用于反转录、RT-PCR、qPCR、Northern、点杂交、纯化 mRNA、体外翻译、RNase protection assay、cDNA 克隆等下游实验; 也可用于基因表达芯片分析、高通量测序等对 RNA 质量要求较高的情况。

产品应用

基于离心柱法从动物组织或培养的动物细胞中安全、快速、便捷、稳定、高效、高质量地提取长度大于 200 个核苷酸 (nucleotide, nt) 的 RNA。

储存条件

室温保存, 一年有效。

产品信息

组分编号	组分名称	规格 12 T	规格 50 T	规格 200 T
HX3017-1	Buffer P1 (裂解液)	8 ml	32 ml	125 ml
HX3017-2	Buffer P2 (结合液)	8 ml	32 ml	125 ml
HX3017-3	Buffer WB1 (洗涤液 I)	8 ml	32 ml	125 ml
HX3017-4	Buffer WB2 (洗涤液 II)	15 ml	63 ml	125 ml×2
HX3017-5	Buffer EB (洗脱液)	1.2 ml	5 ml	15 ml
HX3017-6	RNA 纯化柱及废液收集管	12 套	50 套	200 套
HX3017-7	RNA 洗脱管	12 个	50 个	200 个

注意事项

- 对于富含 RNase 的样品 (如动物组织), 建议使用前在 Buffer P1 中添加二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) 至终浓度为 40 mM (如 1 ml Buffer P1 中加入 20 μ l 2 M DTT) 或 β -巯基乙醇至终浓度为 1% (如 1 ml Buffer P1 中加入 10 μ l β -巯基乙醇)。含 DTT 或 β -巯基乙醇的 Buffer P1 可在室温放置 1 个月。
- 通过本试剂盒提取得到的 RNA 已经去除绝大多数 DNA, 通常情况无需 DNase 处理。后续如进行某些对 DNA 残留较敏感的实验时, 可以在使用说明中步骤 4 离心后, 在纯化柱中加入适量 DNase I 进行消化, 具体请参考使用说明。
- 本试剂盒提供的所有试剂和耗材都是 RNase-free, 操作时应小心, 避免被污染。所有自行准备的试剂和耗材也都应是 RNase-free。如果可能有 RNase 污染, 可考虑用 0.01% 的 DEPC 水浸泡过夜, 然后高温高压灭菌并烘干。操作时应避免对着样品或所使用的试剂盒耗材呼气或说话, 以防 RNase 污染。建议戴一次性口罩操作。
- 使用冻存的细胞或组织提取 RNA 的效果通常比新鲜的细胞或组织差一些。因为在细胞或组织冻融过程中一些细胞或组织内的 RNase 会被释放出来并剪切样品中的 RNA。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行, 操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。
- 废液收集管在一次提取中需多次使用, 切勿中途丢弃。Buffer P2、Buffer WB1、2 中含有乙醇, 使用后须旋紧瓶盖以防挥发, 并须按照易燃试剂的相关规范进行存放和使用。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

1. 样品的准备:

- a. 细胞样品: 收集 50-100 万左右的细胞。对于悬浮细胞, 1000-2000×g 离心 1 min 后弃上清, 加入 300 μl Buffer P1, 轻轻吹打 8-10 次至固悬物溶解、溶液澄清; 对于贴壁细胞, 吸净培养液后加入 300 μl Buffer P1, 轻轻吹打 5-10 次至固悬物溶解、溶液澄清, 转移至一洁净离心管内。
- b. 组织样品: 取 15-20 mg 动物组织, 置于液氮中研磨成粉末, 立即加入 600 μl Buffer P1。也可将组织置于 1.5 ml 离心管中, 迅速加入 600 μl 冰浴预冷的 Buffer P1, 用微型电动匀浆器或普通玻璃匀浆器进行匀浆。研磨或匀浆后, 轻轻吹打匀浆液 8-10 次, 室温放置 3-5 min。然后约 14,000×g 离心 2 min, 将上清液移至新的离心管中。对于比较容易裂解且匀浆很充分的组织 (如肝组织、脑组织等) 可以不用高速离心而直接进入步骤 2。

注: 细胞的数量一般不超过 500 万, 不超过 100 万细胞宜使用 300 μl Buffer P1, 多于 100 万细胞宜使用 600 μl Buffer P1。动物组织的用量一般不超过 30 mg, 用量过多可能会因裂解不充分导致得率下降。组织样品在裂解和离心后, 离心管下部可能会有一些胶状物质, 宜作为上清转移至下一步操作。如果弃除胶状物, 会导致得率下降约 30-50%。后续加入 Buffer P2 后胶状物会消失。离心是为了去除未匀浆充分的明显块状物。如果裂解后仍有粘稠物, 需增加吹打次数至溶液完全澄清。对于富含 RNase 的样品, Buffer P1 中宜添加 DTT 至终浓度为 40 mM 或添加 β-巯基乙醇至终浓度为 1%。

2. 加入等体积 Buffer P2 至裂解产物中, 轻轻颠倒混匀 3-5 次。此时可能会有沉淀物产生, 属于正常现象。
3. 将混合物 (包括沉淀物) 转移至纯化柱内, 12,000×g 离心 30 sec, 倒弃收集管内液体。

注: 当裂解产物的体积大于 300 μl 时, 在加入等体积 Buffer P2 后, 总体积会超过纯化柱的容量, 这时应分成两次过柱, 即将一半的混合物过柱后, 再将剩余的混合物重复步骤 3 一次。对于一些特殊的样品, 如出现溶液未完全通过时, 可延长离心时间至 1-2 min, 或者加大离心力至 16,000×g。对于一些能快速启动达到 12,000×g 的离心机, 离心 30 sec 已经足够, 对于一些启动速度缓慢的离心机本步骤及后续步骤中的 30 sec 离心宜调整为 60 sec。

4. 加入 600 μl Buffer WB1, 12,000×g 离心 30 sec, 倒弃收集管内液体。
5. **选做:** 抽提得到的 RNA 已经去除绝大多数 DNA, 通常情况无需 DNase 处理。后续如进行某些对 DNA 残留较敏感的实验时, 可在本步骤离心后, 在纯化柱中加入 80 μl 含 10 U DNase I 的酶溶液 (**每 80 μl 酶溶液按照 71.8 μl 水加 8 μl 10X Reaction Buffer 再加 0.2 μl 50 U/μl DNase I 混合配制而成**), 室温放置消化 15 min。消化结束后, 不需要进行离心等任何额外的操作, 直接进入步骤 5。
6. 加入 600 μl Buffer WB2, 12,000×g 离心 30 sec, 倒弃收集管内液体。
7. 重复步骤 6 一次。
8. 最高速 (约 14,000-16,000×g) 离心 2 min, 去除残留的液体。

9. 将 RNA 纯化柱置于 RNA 洗脱管中，加入 30-50 μ l Buffer EB，室温放置 2-3 min，最高速离心 30 sec，所得溶液即为纯化的 RNA。

注：Buffer EB 需要加到纯化柱柱面中央，使其被完全吸收。如需获得更高浓度的样品，可把 Buffer EB 的体积减小至 20 μ l，但洗脱下来的 RNA 量会相对减少。室温较低时，Buffer EB 在 37°C 预热片刻对得率有所帮助。此外，洗脱后的溶液再次加回到原纯化柱再离心洗脱一次，可提高得率约 10-30%；或者在第一次洗脱后使用新的 Buffer EB 再洗脱一次，会获得约为第一次洗脱量 15-40% 的 RNA。