天
净
沙
系
列

CAT#:971201-50
常温运输和保存

BINGENE

动物 RNA 纯化试剂盒（过柱法）

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>本产品是天泽基因动物总 RNA 快速提取试剂动物 RNA_{OUT} 的柱式升级产品，可用于从各种动物组织（包括白细胞）快速提取总 RNA。跟动物 RNA_{OUT} 相比其主要特点是：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 操作更加简单快速，整个过程只需要不到十分钟（对一个样品而言）。 2. RNA 纯度更高，OD260/OD280 一般在 2.0 左右。 3. 一般不含用 RT-PCR 可以检测到的基因组 DNA 污染。 4. 适用于培养细胞、大部分动物组织和部分植物组织。 5. 得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern 杂交、cDNA 合成等实验 6. 性价比高于进口的柱式 RNA 提取产品。 7. 可以进行无氯仿操作，只是纯度稍微降低，但不影响使用。 																												
<p>规格及成分</p>	<p style="text-align: center;">本产品使用大纸盒包装</p> <table border="1" data-bbox="427 855 1388 1299"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>规格</th> <th>包装材料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>动物 RNA 纯化溶液 A</td> <td>971201a</td> <td>50 mL</td> <td>60mL 棕色瓶</td> </tr> <tr> <td>动物 RNA 纯化溶液 B</td> <td>971201b</td> <td>25 mL</td> <td>30mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>离心吸附柱</td> <td>211207</td> <td>50 套</td> <td>塑料袋</td> </tr> <tr> <td>通用洗柱液</td> <td>220143</td> <td>50 mL</td> <td>60mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>RNA 洗脱液</td> <td>971207</td> <td>10 mL</td> <td>10mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>971201sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装材料	动物 RNA 纯化溶液 A	971201a	50 mL	60mL 棕色瓶	动物 RNA 纯化溶液 B	971201b	25 mL	30mL 本色瓶	离心吸附柱	211207	50 套	塑料袋	通用洗柱液	220143	50 mL	60mL 本色瓶	RNA 洗脱液	971207	10 mL	10mL 本色瓶	使用手册	971201sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																										
动物 RNA 纯化溶液 A	971201a	50 mL	60mL 棕色瓶																										
动物 RNA 纯化溶液 B	971201b	25 mL	30mL 本色瓶																										
离心吸附柱	211207	50 套	塑料袋																										
通用洗柱液	220143	50 mL	60mL 本色瓶																										
RNA 洗脱液	971207	10 mL	10mL 本色瓶																										
使用手册	971201sc	1 份	无																										
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存，溶液 A 需要放 4℃ 长期保存，有效期一年。</p>																												
<p>自备试剂</p>	<p>氯仿。</p>																												
<p>使用方法</p>	<p>下面的操作步骤是针对在 1.5 mL 塑料离心管中进行的微量提取的，如果处理样品量大，请按比例增加各成份的用量并使用大的离心管和离心机。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 根据组织细胞类型的不同分为下面及种情况使用： <ol style="list-style-type: none"> a) 对贴壁细胞：吸尽培养液，在每 10 平方厘米细胞中加入 1 mL 动物 RNA 纯化溶液 A，用枪轻柔吹打数次，确保细胞全部裂解并且让基因组 DNA 充分断裂。 b) 对悬浮细胞：离心收集细胞，吸尽液体，在每 $1-5 \times 10^6$ 悬浮细胞中加入 1 mL 动物 RNA 纯化溶液 A，用枪轻柔吹打数次，确保细胞全部裂解并且让基因组 DNA 充分断裂。如果是 fibroblasts 或 carcinoma cell，1 mL 溶液 A 的细胞使用量不要超过 1×10^6 个细胞。 c) 对新鲜组织：先将剪切成小块新鲜组织或液氮保存的组织放入 10 mL 或 																												

15 mL 塑料离心管中,每 50-100 mg 组织加 1 mL 动物 RNA 纯化溶液 A,用 Polytron 剪切式匀浆器匀浆 30 秒左右。对肝、脾、胰、肾等细胞分裂十分旺盛的组织(细胞中含大量正在复制的 DNA),建议组织的使用量不要超过 50 mg/ mL 动物 RNA 纯化溶液 A,否则十分容易产生 DNA 污染。也可以用液氮研磨:在研钵中加入液氮,再加入 50-100mg 新鲜组织,然后研磨成粉后转移到 1.5mL 离心管中,再加入 1mL 动物 RNA 纯化溶液 A,震荡 30 秒混匀。

- d) 对 RNA_{LOCKER} 保存组织:先用纸吸去 RNA_{LOCKER} 液体后再剪切成小块,其余操作同新鲜组织的处理。
2. 如果进行无氯仿操作(所得 RNA 纯度稍低,但一般不影响后续使用),则将上步所得的细胞裂解物或匀浆液转移至一个干净的 1.5 mL 塑料离心管中,12,000 rpm 室温离心 3-5 分钟。
 3. 如果进行带氯仿操作(所得 RNA 纯度比免氯仿操作稍高),则将上步所得的细胞裂解物或匀浆液转移至一个干净的 1.5 mL 塑料离心管中,然后加入 0.2 倍体积的自备氯仿(1 mL 动物 RNA 纯化溶液 A 需 0.2 ml 氯仿),振荡器上充分振荡混匀 30 秒,12,000 rpm 室温离心 3-5 分钟。
 4. 将上清液转移到一个干净的 2 mL 塑料离心管中。注意:无氯仿操作时,离心后管底是细胞碎片和结缔组织纤维。带氯仿操作时,离心后分上下层,下层有机相和上下层中间含有 DNA 和蛋白质,吸取上清时避免触及,否则将产生蛋白质和 DNA 污染。为保险起见,可以留下 100 uL 上清液不取。同时吸取上清时最好缓慢进行。
 5. 加入等体积的动物 RNA 纯化溶液 B,充分颠倒混匀。
 6. 分次(一般需要 2-3 次)将加入动物 RNA 纯化溶液 B 后的混合液转移到离心吸附柱中,12,000 rpm 室温离心半分钟,弃穿透液。如果溶液粘稠,可以延长离心时间到 2 分钟。
 7. 加 0.7 mL 通用洗柱液到离心吸附柱中,12,000 rpm 室温离心半分钟,弃收集管中的穿透液。一次洗涤一般足够去除杂质。
 8. 再加 0.3 mL 通用洗柱液到离心吸附柱中,12,000 rpm 室温离心半分钟,弃穿透液。此步可以省略。
 9. 再室温 12,000 rpm 干甩半分钟。此步十分重要,否则残留的通用洗柱液会影响 RNA 的使用。
 10. 将离心吸附柱转移到一自备的 RNase-free 1.5mL 塑料离心管中,加入 50-100 uL RNA 洗脱液。

	<p>11. 室温 12,000 rpm 离心半分钟，离心管中溶液即为 RNA 样品，可以立即使用或存放于-80℃待用。</p> <p>12. RNA 的电泳检测：本试剂盒提取的 RNA 最好用甲醛变性胶电泳，如果在非变性的普通琼脂糖胶 (in TAE 或 TBE buffer) 上电泳，一定要使用 RNA 专用上样液 RNAon (操作详见 RNAon 使用手册)，千万不要使用常用的 DNA 上样液，因为 DNA 上样液没有经过 RNase 处理，也不能将 RNA 变性，得到的带型将十分杂乱。</p> <p>13. RNA 完整性的电泳检测：如果需要做 Northern 杂交，强烈建议用户使用甲醛变性胶进行 RNA 电泳，因为非变性胶不能分离所有的 RNA 分子 (BioTechniques, 28: 414, 2000)。</p> <p>14. RNA 产量产率测定：将 5-10 μL RNA 溶于 TE 缓冲液中 (pH7.5-8.2 之间) 检测其在 OD260 的光吸收。通过光吸收可以得出 RNA 浓度 (1 OD260 的 RNA=40 μg/mL)，进而计算出 RNA 的产量 (浓度 X 体积) 和产率 (RNA 产量/组织用量)。</p> <p>15. RNA 纯度测定：无污染的总 RNA 的 OD260/OD280 一般在 1.8-2.1 之间 (具体数值与其碱基组成和溶液成分等多种因素有关)，高于此范围则分别表示样品可能有蛋白质污染，但一般不影响 RT-PCR 等反应。</p>
<p>疑难解答</p>	<p>Q: 上样孔里的红色荧光物一定是 DNA 污染吗?</p> <p>A: 不是。用 TAE 或 TBE 电泳液和非变性胶电泳 RNA 时容易产生此现象，天泽基因初步研究发现大部分红色荧光物是变性不充分的单链 RNA 通过碱基互补或通过硼酸络合 (如果使用 TBE 作电泳液的话) 形成的复合物，加 RNase 处理后，这些红色荧光物 (RNA) 一般会消失。为避免此现象，建议最好使用甲醛变性胶电泳和 RNA 专用上样液 (如天泽基因的 RNAon)。</p> <p>Q: 如何确认和去除污染的基因组 DNA?</p> <p>A: 如果怀疑有 DNA 污染，可以用 RNase 处理 RNA 样品，然后再电泳。如果上样孔里的红色荧光物不消失，则表示是基因组 DNA 污染。进一步确认可以使用 PCR 扩增法。去除污染的 DNA 可以使用天泽基因的非酶的 DNA 去除剂 DNA Erasol 或 RNase-free DNase，由于 RNase-free DNase 一般都有残留的 RNase 污染，所以必须严格按照厂家提供的使用手册进行操作。</p>
<p>关联产品</p>	<p>DNA 清除剂 (过柱法)</p>