

版本号: DP210831

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
蛋白酶K (Proteinase K)	500 μ l
研磨杵(Grinding Pestles)	10 个
无RNA酶双蒸水(RNase-Free ddH ₂ O)	40 ml
RNase-Free吸附柱CR3 (含2 ml收集管) (RNase-Free Columns CR3 set)	50 套
RNase-Free DNase I (1500 U)	1 支
RDD缓冲液(DNA消化缓冲液) (Buffer RDD (DNA Digest Buffer))	4 ml
无RNA酶双蒸水(RNase-Free ddH ₂ O)	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和RDD缓冲液置于2-8℃保存, 可保存一年; 其他试剂室温(15-30℃)保存, 可保存一年。加入 β -巯基乙醇的裂解液RL 2-8℃可放置一个月。

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，基本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℃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 ddH₂O。（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 2-8℃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 ddH₂O中，轻柔混匀，分装后-30~-15℃贮存（可保存9个月）。

注意：从-30~-15℃融化后的DNase I储存液保存于2-8℃（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 μ l裂解液RL (使用前请先检查是否已加入 β -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 μ l RNase-Free ddH₂O和10 μ l Proteinase K，混匀后56°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×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×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 μ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400×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 μ l DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70 μ l RDD缓冲液，轻柔混匀。

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

7. 向吸附柱CR3中加入350 μ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400×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 μ 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×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×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。



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

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 μl RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，12,000 rpm (~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 μl ，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： OD₂₆₀/OD₂₈₀比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA，OD₂₆₀/OD₂₈₀读数在1.8-2.1之间，比值为2.0是高质量RNA的标志。OD₂₆₀/OD₂₈₀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OD₂₆₀/OD₂₈₀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 ddH₂O稀释n 倍，用RNase-Free ddH₂O将分光光度计调零，取稀释液进行OD₂₆₀，OD₂₈₀测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：

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