

For research use only

Version Number: 2.1

## Animal Total RNA Isolation Kit

For total RNA purification from animal tissues and 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 <sub>2</sub> 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，操作时请注意戴上手套和进行相关防护措施。

### 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的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。

全体系 RNase-Free，使得提取的 RNA 无降解；Buffer RW1、Buffer RW2 缓冲液洗涤体系，使得获得的 RNA 纯度极高。

### 储存条件

- ❖ 本试剂盒在常温(15-25°C)干燥条件下，可保存 24 个月；如需保存更长时间可置于 2-8°C。
- ❖ Buffer RL1 在加入β-巯基乙醇(可选择不加)后可在 4°C 放置 1 个月(建议现做现添加)。

注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。

### 注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 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。
- ❖ 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 RNA 降解且提取量也会下降。
- ❖ 动物组织样本的用量不要超过 20 mg，否则会影响 RNA 产量和纯度。
- ❖ 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。
- ❖ 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 产率和质量与细胞样本用量和洗脱体积有关，建议每 500 μL Buffer RL1 使用组织 10-20 mg。
- ❖ 洗脱体积：洗脱液体积不应少于 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，若低温存放后有晶体析出，可将 Buffer 放置于室温或 37°C 一段时间，将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 × 10<sup>6</sup>。

### 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。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。

1. 根据组织来源按以下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 μL Buffer RL1，用玻璃匀浆器或电动匀浆器将组织研磨均匀。

注意：组织量不要超过 20 mg，否则可能会造成 DNA-Cleaning Column 发生堵柱现象，导致 RNA 的质量下降。

b) 培养细胞：

1) 贴壁细胞：不须消化，可直接用 Buffer RL1 进行消化、裂解；或者离心收集细胞后加入 Buffer RL1，**1-5 × 10<sup>6</sup> 细胞**加入 **500 μL 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 Buffer RL1，**1-5 × 10<sup>6</sup> 细胞**加入 **500 μL 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 的污染，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 h，在 4°C 中保存约 1 周，更长时间保存请存放于 -80°C，使用时将溶液在室温或 37°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 ×g) 离心 2 min。移除 DNA-Cleaning Column，保留收集管内上清液。

注意：若组织使用量大于 20 mg 或组织研磨后块状碎片太多，先将匀浆液移至 1.5 mL 离心管中，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 5 min，再将上清液转移至过滤柱中，进行步骤 2 操作。如果 DNA-Cleaning Column 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 μL)中加入 **1.6 倍体积 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。例如：500 μL 上清液中加入 800 μL Buffer RL2(已加入无水乙醇)。如果混合液出现浑浊或絮状沉淀，请直接进行步骤 4 即可。

4. 将 700 μL 混合液转移至 RNA-Only Column 中(纯化柱放入收集管中)，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min，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. 将纯化柱放回收集管中，将剩余混合液全部加入纯化柱中，12,000 rpm (~13,400 ×g)，离心 1 min，弃掉收集管中的废液。

6. 向纯化柱中加入 **500 μL Buffer RW1**，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min，弃掉收集管中废液。

7. 向纯化柱中加入 **700 μL Buffer RW2**(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min，弃掉收集管中废液。

8. 重复步骤 7。

9. 将纯化柱放回收集管中，12,000 rpm (~13,400 ×g) 空管离心 2 min，去掉离心柱中残余的 Buffer RW2。

10. 将纯化柱转移至新的离心管中，向纯化柱的膜中央滴加 **50-200 μL** 已于 65°C 预热的 **RNase-Free ddH<sub>2</sub>O**(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 ×g) 离心 1 min 收集 RNA 溶液。

