

For research use only

Version Number: 2.2

Cell Total RNA Isolation Kit

For total RNA purification from cultured cells: $10^4 \leq \text{Cultured Cells} \leq 10^6$

试剂盒组成	RE-03111	RE-03113
	50 T	200 T
Buffer cRL1*	25 mL	100 mL
Buffer cRL2	15 mL	60 mL
Buffer RW1*	25 mL	100 mL
Buffer RW2	24 mL	96 mL
RNase-Free ddH ₂ 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 cRL1、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，可以高效率的从 96、24、12、6 孔板培养细胞中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细胞裂解物分离并吸附除去基因组 DNA，操作简便、省时；RNA-Only Column 能高效的结合 RNA，搭配独特的配方，可以同时处理大量样品。

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 cRL1 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。
- ❖ 如提取的 RNA 用于克隆全长 cDNA，每 1 mL Buffer cRL1 加入 10 μL β-巯基乙醇(建议现配现用)，Buffer cRL1 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 cRL2 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 250 μL Buffer RL1 使用细胞的量不超过 10^6 。
- ❖ 洗脱体积：洗脱液体积不应少于 20 μL，否则会影响 RNA 回收效率。
- ❖ 请检查试剂盒中的 Buffer cRL1 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

- ❖ 培养细胞：单次处理，用量请勿超过 10^6 。

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 cRL2 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 cRL1 加入 10 μL β-巯基乙醇。

1. 根据组织来源按以下说明进行细胞裂解。
 - a 贴壁细胞：将培养皿倾斜约 30°，使用移液器或移液管缓慢吸去培养基，务必彻底吸除干净，然后加入 Buffer cRL1(加入量见下表)进行消化、裂解(将 Buffer cRL1 完全覆盖培养皿，倾斜培养皿，使用移液器将细胞全部吹打下来)；或者使用胰酶消化细胞，离心收集细胞后参照下表加入 Buffer cRL1(加入量见下表)，用移液器反复吹打混匀(直到看不到细胞团为止)。

注意: 务必将细胞培养皿中的液体彻底吸干净, 否则会很大程度上影响 RNA 的得率和纯度。

- b 悬浮细胞: 直接离心收集细胞, 参照下表加入 Buffer cRL1(加入量见下表), 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 cRL1 不会受到 RNase 的污染, 如果细胞在加入 Buffer cRL1 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。

表: 细胞数量与试剂使用量关系列表

培养器皿	细胞数量	试剂添加量	
		Buffer cRL1	Buffer cRL2
96/48/24/12 孔板	<10 ⁶	250 μL	400 μL
6 孔板/3.5 cm 板	~10 ⁶	500 μL	800 μL
6 cm 或更大的细胞培养瓶	>10 ⁶	建议使用 Animal Total RNA Isolation Kit(RE-03011) 或取不超过 10 ⁶ 细胞使用 Cell Total RNA Isolation Kit	

2. 将裂解好的细胞混合液转移至 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: 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. 向上述上清液中加入 **1.6 倍体积 Buffer cRL2**(加入量见上表)(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇), 轻柔混匀。

注意: Buffer cRL2 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: 250 μL 上清液中加入 400 μL Buffer cRL2(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. 将混合液全部转移至 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。若细胞数量为 6 孔板或 3.5 cm 板, 请分两次将混合液全部过柱。

5. 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。

6. 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。
7. 重复步骤 6。
8. 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。
9. 将纯化柱转移至新的 RNA 收集管中, 向纯化柱的膜中央滴加 **20-50 μL** 已于 65°C 预热的 **RNase-Free ddH₂O**(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。
- 注意: 硅胶膜会吸附少量的液体, 洗脱后所得的 RNA 产物体积会有所偏差。增加洗脱体积可提高 RNA 产量, RNase-Free ddH₂O 加入体积不应低于 20 μL, 体积过小会影响洗脱效率。得到的 RNA 溶液可直接用于下游实验或置于 -80°C 保存。由于本试剂盒对 RNA 二级结构保护较好, 建议凝胶电泳之前, 先将得到的 RNA 溶液置于 72°C 变性处理 5-10 min。**
10. 将离心得到的 RNA 溶液重新加至纯化柱中, 重复步骤 9 (对 RNA 得率要求不高, 可忽略此步骤)。

