

# BonaPure Animal Tissue Total RNA Extraction Kit

## 高效动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒（双柱型）

货号

RE131

### 产品组成

组分	规格（50 次）
裂解液 FRL（Buffer FRL）	30 mL
去蛋白液 FRW（Buffer FRW）	40 mL
漂洗液 FRW1（Buffer FRW1）	12 mL
蛋白酶 K（Proteinase K）	500 μL
无 RNA 酶双蒸水（RNase-Free ddH <sub>2</sub> O）	15 mL
RNase-Free BonaPure RNA Columns（含 2.0 mL 收集管）	50 套
RNase-Free BonaPure gDNA Remove Columns(含 2.0 mL 收集管)	50 套

### 保存条件

常温（10~25℃）保存 12 个月，蛋白酶 K -20℃保存。

### 产品简介

本试剂盒可从≤20 mg 动物软组织(肝脏、脾脏、肾脏，脑等)、≤1×10<sup>7</sup> 个培养细胞中快速提取总 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用 DTT 及β-巯基乙醇，整个提取过程可在 30 min 内完成。试剂盒结合 DNA 过滤技术，可高效地过滤去除基因组 DNA，提取的总 RNA 纯度高，无蛋白和其它杂质的污染，可用于 RT-PCR、Northern Blot、Poly A 纯化、RNase 保护分析和体外翻译等实验。

### 产品特点

- ✧ 操作简便：30 min 内完成数个样品的总 RNA 提取；
- ✧ 高效去除基因组 DNA：独特的基因组 DNA 过滤柱，无需 DNase 处理；
- ✧ 安全低毒：无需 DTT 及β-巯基乙醇等有毒试剂；
- ✧ RNA 纯度高：提取的 RNA 无杂质残留，适用于对纯度、完整性要求很高的下游实验。

## 适用范围

本品适用于动物软组织、细胞等样品的总 RNA 提取。

## 注意事项

1. 第一次使用前应在漂洗液 Buffer FRW1 中加入 48 mL 的无水乙醇；
2. 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染，经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌、汗液及 RNase 等，可能导致 RNA 降解；
3. RNA 在裂解液 FRL 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、灭菌；
4. 配制溶液如 70%乙醇应使用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O（将水加入干净的玻璃瓶中，加 DEPC 至终浓度为 0.1%(V/V)，混匀放置过夜后高压灭菌）。

## 使用方法

### 一、从动物组织中提取总 RNA

1. 每 10~20 mg 组织加 350 μL Buffer FRL，用电动匀浆器将组织彻底匀浆，然后加入 10 μL Proteinase K，混匀后室温放置 5 min；

**注意：**脾脏组织建议使用 5 mg，肌肉类的组织可以增加至 50~100 mg。

2. 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2~5 min，取上清，按第 3 步进行操作；

### 二、从培养细胞中提取总 RNA

本产品单次可处理 10<sup>2</sup>~10<sup>7</sup> 个细胞。初次使用时，建议使用 2~5×10<sup>6</sup> 个细胞。根据结果再调整细胞量。但不论何种情况，细胞量不要超过 1×10<sup>7</sup>。

1. 加入适量的 Buffer FRL 至细胞样品中，打散细胞；
  - 1) 悬浮细胞：离心收集的细胞，弹打或涡旋松散细胞沉淀，加入适量 Buffer FRL (用量详见下表) 和 10 μL Proteinase K，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

细胞量	裂解液 FRL
< 5×10 <sup>6</sup> 个细胞	350 μL
≥ 5×10 <sup>6</sup> 个细胞	600 μL

- 2) 贴壁细胞：可直接在培养容器中裂解（容器直径不超过 10 cm），或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀。

- a. 直接裂解法：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入适量的 Buffer FRL (用量详见下表)和 10  $\mu$ L Proteinase K。

培养皿直径	裂解液 FRL
< 6 cm	350 $\mu$ L
6~10 cm	600 $\mu$ L

- b. 胰蛋白酶处理法：彻底吸弃培养液，用 PBS 洗涤细胞，吸除 PBS，加入含有 0.10%~0.25% 胰蛋白酶的 PBS 处理细胞，当细胞脱离容器壁时，加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶，将细胞溶液转移至 RNase-Free 的离心管中，300 $\times$ g 离心 5 min，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清，加入适量的 Buffer FRL (用量详见下表)和 10  $\mu$ L Proteinase K。

细胞量	裂解液 FRL
< 5 $\times$ 10 <sup>6</sup> 个细胞	350 $\mu$ L
$\geq$ 5 $\times$ 10 <sup>6</sup> 个细胞	600 $\mu$ L

2. 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 2~5 min，取上清，按第 3 步进行操作；

**注意：**样品量过多，裂解不充分会导致裂解液粘稠，堵塞 gDNA 过滤柱，如果裂解液非常粘稠可适当增加裂解液用量。

3. 把 RNase-Free BonaPure gDNA Remove Column 放在 2 mL 收集管中，把细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 30 s，保留滤液；

**注意：**组织裂解液需高速离心去除杂质，细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些样品时，离心后裂解液表面还可能会有一层脂类层，转移上清液尽量不要吸到这些物质。若 gDNA 过滤柱堵塞，可将滤液吸出加入适量裂解液匀浆后再转移至新的 gDNA 过滤柱中。

4. 丢弃 gDNA 过滤柱，滤液中加入等倍体积 70%乙醇，用移液枪吸打 3~5 次；
5. 把 RNase-Free BonaPure RNA Column 放在 2 mL 收集管中，将溶液和沉淀一起转移至吸附柱中。12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，把吸附柱放回收集管中；
6. 如不进行 DNase I 消化，加入 700  $\mu$ L Buffer FRW 至吸附柱上，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，把吸附柱放回收集管中；
7. （可选）若后续实验对 RNA 纯度比较严格，可选择使用 DNase I (需另外订购) 进行膜上 DNase 消化；

- 1) 向 RNase-Free 吸附柱中加入 350  $\mu$ L Buffer FRW, 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )离心 30 s, 弃
- 2) 废液, 将吸附柱放回收集管中;
- 3) 向吸附柱中央加入 DNase I 工作液, 室温放置 15 min;
- 4) 向 RNase-Free 吸附柱中加入 350  $\mu$ L Buffer FRW, 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )离心 30 s, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中;
8. 加入 500  $\mu$ L Buffer FRW1 (**使用前请先检查是否加入乙醇**)至吸附柱中, 室温静置 2 min, 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )离心 30 s, 倒掉废液, 把吸附柱放回收集管中;
9. 重复步骤 8;
10. 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )离心 2 min, 倒掉废液, 将吸附柱置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残留的漂洗液;

**注意:** 此步骤目的是将吸附柱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。

11. 将吸附柱转移至新的 RNase-Free 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 30~100  $\mu$ L RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 室温静置 2 min, 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )离心 2 min, 得到 RNA 溶液, 将洗脱的 RNA 溶液置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。

**注意:** 洗脱缓冲液体积不应少于 30  $\mu$ L, 体积过小影响回收效率。

## 常见问题与解决办法

### Q1: 柱子出现堵塞?

A1:

- 1) 样品过量。裂解液粘稠, 减少样品量或加大裂解液用量, 样品量过多反而会降低产量和纯度;
- 2) 裂解液离心不充分。组织裂解液需高速离心去除杂质, 杂质会引起柱子的堵塞, 转移上清液尽量不要吸到杂质;
- 3) 离心温度过低。本产品使用操作均在室温下进行。

### Q2: RNA 提取过程中 gDNA 过滤柱堵塞?

A2:

- 1) 增加离心次数、时间或转数;
- 2) 可将滤液吸出加入适量裂解液匀浆后再转移至新的 gDNA 过滤柱中。