

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 ₂ 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°C) 保存 12 个月，蛋白酶 K -20°C 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)、≤1×10⁷ 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°C 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 ddH₂O（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到 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 10²~10⁷ 个细胞。初次使用时，建议使用 2~5×10⁶ 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 1×10⁷。

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 ⁶ 个细胞 | 350 μL |
| ≥5×10 ⁶ 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 μL Proteinase K。

| 培养皿直径 | 裂解液 FRL |
|---------|---------|
| < 6 cm | 350 μL |
| 6~10 cm | 600 μL |

- 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×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 μL Proteinase K。

| 细胞量 | 裂解液 FRL |
|-------------------------|---------|
| < 5×10 ⁶ 个细胞 | 350 μL |
| ≥5×10 ⁶ 个细胞 | 600 μL |

2. 12,000 rpm (~13,400×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×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×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 μL Buffer FRW 至吸附柱上，12,000 rpm (~13,400×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 μL Buffer FRW, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 30 s, 弃废液, 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 μL Buffer FRW, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 30 s, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中;
8. 加入 500 μL 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 (~13,400×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 (~13,400×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 μL RNase-Free ddH₂O, 室温静置 2 min, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 min, 得到 RNA 溶液, 将洗脱的 RNA 溶液置于-80°C保存。

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。

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。