天净沙系列

CAT#:971201

常温运输和保存

天净沙

动物 RNA 纯化试剂盒（过柱法）

Animal RNA Purification Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于从各种动物组织（包括白细胞）快速提取总 RNA。它具有下列特点：

1. 操作简单快速，整个过程只需要不到十分钟（对一个样品而言）。
2. RNA 纯度更高，OD260/OD280 一般在 2.0 左右。
3. 一般不含用 RT-PCR 可以检测到的基因组 DNA 污染。
4. 适用于培养细胞、大部分动物组织和部分植物组织。
5. 得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern 杂交、cDNA 合成等实验。
6. 性价比高于进口的柱式 RNA 提取产品。
7. 可以进行无氯仿操作，只是纯度稍微降低，但不影响使用。
8. 本产品足够 50 次微量柱式提取，每次可以处理 100 mg 左右的组织。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成份	编号	规格	包装
动物 RNA 纯化溶液 A	971201a	50 mL	60 mL 棕色瓶
动物 RNA 纯化溶液 B	971201b	25 mL	30 mL 本色瓶
硅胶膜离心吸附柱	220144	50 套	塑料袋
通用洗柱液	220143	50 mL	60 mL 本色瓶
RNA 洗脱液	971207	10 mL	10 mL 本色瓶
使用手册	971201sc	1 份	1 份

运输及保存

常温运输和保存，溶液 A 需要放 4℃长期保存，有效期一年。

自备物品

氯仿，台式离心机

使用方法

下面的操作步骤是针对在 1.5 mL 塑料离心管中进行的微量提取的，如果处理样品量大，请按比例增加各成份的用量并使用大的离心管和离心机。

1. 根据组织细胞类型的不同分为下面及种情况使用：

a) 对贴壁细胞：吸尽培养液，在每 10 平方厘米细胞中加入 1 mL 动物 RNA 纯化溶液 A，用枪轻柔吹打数次，确保细胞全部裂解并且让基因组 DNA 充分断裂。

b) 对悬浮细胞：离心收集细胞，吸尽液体，在每 1-5×10^6 悬浮细胞中加入 1 mL 动物 RNA 纯化溶液 A，用枪轻柔吹打数次，确保细胞全部裂解并且让基因组 DNA 充分断裂。如果是 fibroblasts 或 carcinoma cell，1 mL 溶液 A 的细胞使用量不要超过 1E6 个细胞。

c) 对新鲜组织：先将剪切成小块新鲜组织或液氮保存的组织放入 10 mL 或 15 mL 塑料离心管中，每 50-100 mg 组织加 1 mL 动物 RNA 纯化溶液 A，用 Polytron 剪切式匀浆器匀浆 30 秒左右。对肝、脾、胰、肾等细胞分裂十分旺盛的组织（细胞

中含大量正在复制的 DNA)，建议组织的使用量不要超过 50 mg/ mL 动物 RNA 纯化溶液 A，否则十分容易产生 DNA 污染。也可以用液氮研磨：在研钵中加入液氮，再加入 50-100 mg 新鲜组织，然后研磨成粉后转移到 1.5 mL 离心管中，再加入 1 mL 动物 RNA 纯化溶液 A，震荡 30 秒混匀。

d) 对非冻型组织 RNA 保存液或 RNAlater 等保存液保存的组织：先用纸吸去保存液后再剪切成小块，其余操作同新鲜组织的处理。

2. 如果进行无氯仿操作（所得 RNA 纯度稍低，但一般不影响后续使用)，则将上步所得的细胞裂解物或匀浆液转移至一个干净的 1.5 mL 塑料离心管中，12,000×g 室温离心 3-5 分钟。

3. 如果进行带氯仿操作（所得 RNA 纯度比免氯仿操作稍高)，则将上步所得的细胞裂解物或匀浆液转移至一个干净的 1.5 mL 塑料离心管中，然后加入 0.2 倍体积的自备氯仿(1 mL 动物 RNA 纯化溶液 A 需 0.2 mL 氯仿)，振荡器上充分振荡混均 30 秒，12,000×g 室温离心 3-5 分钟。

4. 将上清液转移到一个干净的 2 mL 塑料离心管中。注意：无氯仿操作时，离心后管底是细胞碎片和结缔组织纤维。带氯仿操作时，离心后分上下层，下层有机相和上下层中间含有 DNA 和蛋白质，吸取上清时避免触及，否则将产生蛋白质和 DNA 污染。为保险起见，可以留下 100 μL 上清液不取。同时吸取上清时最好缓慢进行。

5. 加入等体积的动物 RNA 纯化溶液 B，充分颠倒混匀。

6. 分次（一般需要 2-3 次）将加入动物 RNA 纯化溶液 B 后的混合液转移到硅胶膜离心吸附柱中，12,000×g 室温离心半分钟，弃穿透液。如果溶液粘稠，可以延长离心时间到 2 分钟。

7. 加 0.7 mL 通用洗柱液到硅胶膜离心吸附柱中，12,000×g 室温离心半分钟，弃收集管中的穿透液。一次洗涤一般足够去除杂质。

8. 再加 0.3 mL 通用洗柱液到硅胶膜离心吸附柱中，12,000×g 室温离心半分钟，弃穿透液。此步可以省略。

9. 再室温 12,000×g 干甩半分钟。此步十分重要，否则残留的通用洗柱液会影响 RNA 的使用。

10. 将硅胶膜离心吸附柱转移到一自备的 RNase-free 1.5 mL 塑料离心管中，加入 50-100 μL RNA 洗脱液。

11. 室温 12,000×g 离心半分钟，离心管中溶液即为 RNA 样品，可以立即使用或存放于-80℃待用。

12. RNA 的电泳检测：本试剂盒提取的 RNA 最好用甲醛变性胶电泳，如果在非变性的普通琼脂糖胶（in TAE 或 TBE buffer）上电泳，一定要使用 RNA 专用上样液，

	千万不要使用常用的 DNA 上样液，因为 DNA 上样液没有经过去 RNase 处理，也不能将 RNA 变性，得到的带型将十分杂乱。 13. RNA 完整性的电泳检测：如果需要做 Northern 杂交，强烈建议用户使用甲醛变性胶进行 RNA 电泳，因为非变性胶不能分离所有的 RNA 分子（BioTechniques，28：414，2000)。 14. RNA 产量产率测定：将 5-10 μL RNA 溶于 TE 缓冲液中(pH 7.5-8.2 之间)检测其在 OD260 的光吸收。通过光吸收可以得出 RNA 浓度（1 OD260 的 RNA=40 μg/mL)，进而计算出 RNA 的产量（浓度 X 体积)和产率(RNA 产量/组织用量)。 15. RNA 纯度测定:无污染的总 RNA 的 OD260/OD280 一般在 1.8-2.1 之间(具体数值与其碱基组成和溶液成分等多种因素有关)，高于此范围则分别表示样品可能有蛋白质污染，但一般不影响 RT-PCR 等反应。
疑难解答	Q：上样孔里的红色荧光物一定是 DNA 污染吗? A：不是。用 TAE 或 TBE 电泳液和非变性胶电泳 RNA 时容易产生此现象，本公司初步研究发现大部分红色荧光物是变性不充分的单链 RNA 通过碱基互补或通过硼酸络合（如果使用 TBE 作电泳液的话）形成的复合物，加 RNase 处理后，这些红色荧光物(RNA)一般会消失。为避免此现象，建议最好使用甲醛变性胶电泳和 RNA 专用上样液。 Q：如何确认和去处除污染的基因组 DNA? A：如果怀疑有 DNA 污染，可以用 RNase 处理 RNA 样品，然后再电泳。如果上样孔里的红色荧光物不消失，则表示是基因组 DNA 污染。进一步确认可以使用 PCR 扩增法。去除污染的 DNA 可以使用本公司的 RNase-free DNase。
关联产品	DNA 清除剂（过柱法）