



RNApure Fast Tissue&Cell Kit

组织&细胞RNA快速提取试剂盒

Cat. No. CW0599S

产品简介

本试剂盒采用硅胶柱纯化技术,可从动物组织、细胞中快速提取总RNA。提取过程中无需使用 β -巯基乙醇和酚/氯仿等有毒有害试剂,最快7 min,即可提取得到高质量的RNA。本试剂盒可同时处理大量不同样本,且含有2种提取方案,满足不同需求。提取的总RNA得率高、纯度好、无蛋白质和其他杂质污染,可用于RT-PCR、Real-Time PCR、芯片分析、体外翻译等多种下游实验。

储存条件: 所有组分可在干燥、室温 (15-30°C) 环境稳定保存。

产品内容

Component	CW0599S 50 preps
Buffer RLN	35 mL
Buffer RWA	40 mL
Buffer RW2 (concentrate)	13 mL
RNase-Free Water	10 mL
Proteinase K	550 μ L
gDNA-Filter Columns A with Collection Tubes	50
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes(1.5mL)	50

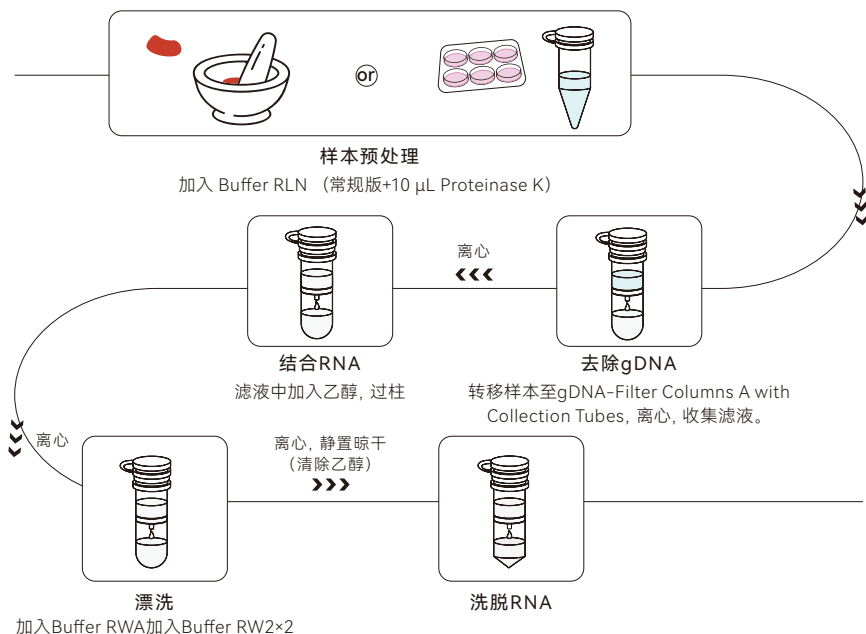
自备仪器试剂

无水乙醇（新开封或提取RNA专用）、RNase-Free 离心管、离心机、RNase-Free枪头、研钵或匀浆器等。

实验前准备及重要注意事项

1. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180°C高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无RNase的水（自备）。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
2. 使用前请检查Buffer RLN是否出现结晶或者沉淀，若出现结晶或者沉淀，可置于56°C加热重新溶解。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer RW2 (concentrate)中加入无水乙醇。
4. 样品处理量请介于10-20 mg组织或者 $<5 \times 10^6$ 个细胞；对于肝脏、脾脏、肾脏等组织，因其DNA与RNA含量丰富，请勿投入超过10 mg，否则会导致提取存在gDNA残留或者RNA产量降低，也可能致使gDNA-Filter Columns A柱堵塞。
5. 提取的样品避免反复冻融，否则影响RNA提取的产量和质量。当使用提取新鲜样本时，若不能及时提取，可将样本立即置于液氮中，速冻，后置于-85~-65°C保存，并避免反复冻融；或将样本立即置于Buffer RLN中匀浆，然后置于-85~-65°C保存。为了避免RNA的降解，应该尽快进行样本的采集与保存。
6. 研磨或者匀浆来破碎样本应彻底，否则容易发生堵塞柱子且会影响RNA的产量；匀浆时尽量控制温度，防止温度过高导致RNA降解的情况。
7. 快速操作中若提取肝脏组织，需用到50%乙醇，请预先用RNase-Free Water（自备）进行配制，且仔细阅读实验流程。
8. 所有的离心步骤若无特殊说明均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。
9. 若下游实验对DNA非常敏感，建议用不含RNase的DNase I（货号CW2090S）对RNA进行处理。

实验流程



操作步骤 (快速)

1. 样本处理

1a. 动物组织匀浆处理: 取新鲜的组织, 每10-20 mg加入500 μL Buffer RLN (肝组织加入350 μL Buffer RLN), 在冰上用玻璃匀浆器或者电动匀浆器进行匀浆处理, 直至无明显组织块即可。

注意: 冰上进行匀浆, 防止局部温度瞬时升高导致RNA降解。

1b. 动物组织-液氮研磨: 将新鲜的组织在液氮中磨碎, 将液氮研磨好的组织粉末立刻转移到Buffer RLN中, 对于每10-20 mg样本加入500 μL Buffer RLN (肝组织用350 μL Buffer RLN), 涡旋震荡直至无明显粉末团即可。

注意: 匀浆完或者液氮研磨处理后的样本, 若不立刻进行提取, 可以将样本置于-85~-65 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1c. 贴壁细胞: 无需消化, 吸弃细胞培养上清后可直接在培养皿中立即加入Buffer RLN进行消化、裂解操作; 或者加入胰酶进行消化后离心收集细胞, 然后加入Buffer RLN裂解液, 每 $<5 \times 10^6$ 个细胞加入500 μL Buffer RLN, 涡旋震荡直至无明显细胞团即可。

1d. 悬浮细胞: 直接离心收集细胞, 加入Buffer RLN裂解液, 每 $<5 \times 10^6$ 个细胞加入500 μL Buffer RLN, 涡旋震荡直至无明显细胞团即可。

注意: 若经过裂解的细胞样本, 若不立即进行提取时, 可以将样本置于-85~-65 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

操作步骤（快速）

2. 将裂解处理后的样本加入gDNA-Filter Columns A with Collection Tubes中，13,000 rpm (~15,800 × g)离心1 min，丢弃gDNA-Filter Columns A，**收集滤液**。
3. 向滤液中加入0.5倍体积的无水乙醇(肝组织样本，加入1倍滤液体积的50%乙醇)，充分混匀。
注意：加入乙醇后可能会产生沉淀，不会影响后续实验。
4. 将步骤3所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱(Spin Columns RM)中，13,000 rpm (~15,800 × g)离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
5. 向Spin Columns RM中加入700 μL Buffer RWA，13,000 rpm (~15,800 × g)离心30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
6. 向Spin Columns RM中加入**700 μL Buffer RW2**（使用前检查是否加入无水乙醇），13,000 rpm (~15,800 × g)离心30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
7. 向Spin Columns RM中加入**500 μL Buffer RW2**（使用前检查是否加入无水乙醇），13,000 rpm (~15,800 × g)离心2 min，小心将吸附柱RM从收集管中取出，期间避免接触到滤液，导致污染。
8. （可选）若吸附柱RM存在液体残留或者接触到滤液，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中，13,000 rpm (~15,800 × g)空离1 min，避免乙醇污染。
9. 将吸附柱置于一个新的RNase-Free离心管中，向吸附柱的中间部位悬空加入30-200 μL RNase-Free Water，室温放置1 min，13,000 rpm (~15,800 × g)离心1 min，收集RNA溶液，-85 ~ -65°C保存RNA，防止降解。
注意：1) RNase-Free Water体积不应小于30 μL，体积过小影响回收率。
2) 如果要提高RNA的产量，可将RNase-Free Water在65°C提前预热，滴加至吸附膜中间部位后，室温静置2 - 5 min；或者离心后进行二次洗脱。

操作步骤（常规）

1. 样本前处理
 - 1.1 动物组织：每10-20 mg新鲜的组织加入350 μL Buffer RLN，用电动匀浆器将组织充分匀浆，加入10 μL Proteinase K，涡旋混匀后在室温静置5 min。
注意：对于脾脏组织，建议使用5 mg样本；肌肉类的组织RNA含量较少，可以增加样本量至50 mg-100 mg。
 - 1.2 细胞样本：

1.2.1 收集细胞:

- a. 收集悬浮细胞: 估计培养的细胞数量, 建议不要超过 1×10^7 个细胞, 然后 $300 \times g$ 离心5 min, 将悬浮细胞收集至离心管中, 吸弃培养基上清液。
- b. 收集单层贴壁细胞: 估计培养的细胞数量, 建议不要超过 1×10^7 个细胞, 然后按照下述1) 直接裂解或者2) 胰蛋白酶处理 (通常采用胰蛋白酶处理在摇瓶中培养的单层贴壁细胞)
 - 1) 直接裂解法: 确定细胞数量, 彻底吸除细胞培养基上清, 立即进行第1.2.2裂解步骤 (在容器中直接裂解时, 容器直径需小于10 cm)。
 - 2) 胰蛋白酶处理法: 确定细胞数量, 吸弃培养基, 用1*PBS清洗细胞, 吸弃PBS, 向细胞中加入胰蛋白酶含量为0.10-0.25%的PBS处理细胞, 当细胞从容器壁脱离时, 加入含有血清的培养基来使胰蛋白酶失活, 然后将细胞溶液转移到RNase-Free的离心管中, $300 \times g$ 离心5 min, 收集细胞沉淀, 吸弃所有上清。

注意: 收集细胞时必须要将细胞培养液去除彻底, 否则会导致裂解不充分。

1.2.2 裂解处理细胞

对于离心收集到的细胞沉淀: 轻弹离心管底部, 以使细胞沉淀松散, 加入下表中推荐的裂解液Buffer RLN体积 和 $10 \mu\text{L}$ Proteinase K, 涡旋震荡。

细胞数量	Buffer RLN (μL)
$< 5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$	650

对于采用直接裂解的细胞: Buffer RLN体积按照下表加入, 将细胞裂解液转移至离心管中, 涡旋震荡混匀。

容器直径 (cm)	裂解液RLN (μL)
< 6	350
6-10	650

2. 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心2-5 min, 取上清进行下步操作。
3. 将得到的上清液转移至gDNA-Filter Columns A with Collection Tubes中, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心30 sec, **收集滤液**。
4. 向滤液中缓慢加入1倍上清体积的70%乙醇, 混匀, 将得到的溶液和沉淀全部加入到Spin Columns RM with Collection Tubes中, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

注意: 加入乙醇后可能会产生沉淀, 不会影响后续实验。
5. 若不进行DNase I消化处理, 向Spin Columns RM中加入 $700 \mu\text{L}$ Buffer RWA, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心30 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中; 若进行DNase I消化, 跳过步骤5, 进行步骤6。

6. DNase I 消化 (可选步骤): 若后续实验对RNA纯度要求比较严格或者微量DNA非常敏感, 可以选择性的进行DNase I 消化。
- 1) 向Spin Columns RM中加入350 μL Buffer RWA, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心30 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
 - 2) 配制DNase I 混合液: 取52 μL RNase-Free Water, 向其中加入8 μL 10 \times Reaction Buffer 和20 μL DNase I (1 U/ μL), 混匀, 配制成终体积为80 μL 的反应液。
注意: 以上体系是按照我公司产品DNase I (CW2090S) 反应体系进行配置, 应用其他公司产品请参考相应说明书。
 - 3) 向Spin Columns RM中直接加入80 μL 配制好的DNase I反应液, 20–30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15min。
 - 4) 向Spin Columns RM中加入350 μL Buffer RWA, 12,000 rpm离心30 sec, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
7. 向Spin Columns RM中加入**500 μL Buffer RW2** (使用前检查是否加入无水乙醇), 室温静置2 min, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心30–60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
8. 重复步骤7。
9. 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心2 min, 倒掉收集管中的废液。将Spin Columns RM置于室温放置2 min, 以彻底晾干。
注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR等)。
10. 将吸附柱置于一个新的RNase-Free离心管中, 向吸附柱的中间部位悬空加入30–100 μL RNase-Free Water, 室温放置2 min, 12,000 rpm离心1 min, 收集RNA溶液, $-85 \sim -65^{\circ}\text{C}$ 保存RNA, 防止降解。

常见问题与解决方案

常见问题	原因	解决方案
吸附柱堵塞	1.投入量过多	减少样本投入量, DNA/RNA含量丰富的特殊样本 (肝、脾及肾脏等), 请勿超过10 mg, 过量的样本投入量反而会降低得率和纯度
	2.样本研磨或匀浆不充分	1) 增加样本研磨或匀浆时间; 2) 将裂解样本先12,000 rpm离心5 min, 部分样本离心后表面可能有脂质层, 转移上清液时请注意;
	3.样品富含肌纤维	肌肉、心脏、皮肤和一些低等生物等富含肌纤维的样本, 应采用液氮研磨方式, 加大研磨程度
	4.裂解液粘稠	增大裂解液体积
	5.复杂样本	高脂肪、高纤维、高蛋白、多糖类、多杂质等复杂样本使用操作步骤 (常规), 并减少投入量

RNA产量低	1.投入量过少	增加投入量，组织请勿超过20 mg，细胞请勿超过 5×10^6 个，过量的样本投入量反而会降低得率和纯度
	2.投入量过多	过多的样本会造成裂解、结合、洗脱不充分，增加堵柱和RNA降解风险，造成产量降低
	3.样本保存不当	内源性RNase、反复冻融或保存温度不合适，导致RNA降解，应采用新鲜或 -80°C 未冻融的样本
	4.样本处理不当，组织研磨或匀浆不充分	1) 增加样本研磨或匀浆时间； 2) 加大裂解液体积和裂解时间；
	5.吸附柱堵柱	见“吸附柱堵塞”一行
	6.结合环境不够	增加结合时乙醇用量，快速法可从0.5倍无水乙醇最高增加到1倍无水乙醇，常规法1倍70%乙醇最高增加到2倍70%乙醇
	7.乙醇残留	进行空离2 min，将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干，小心从收集管上取下吸附柱，避免接触乙醇
	8.洗脱不充分	可将洗脱液在 65°C 提前预热，滴加至吸附膜中间部位后，室温静置2 - 5 min；或者离心后进行二次洗脱。
RNA纯度低	1.投入量过少	RNA浓度低会造成测量的纯度低，可以增加投入量，组织请勿超过20 mg，细胞请勿超过 5×10^6 个，过量的样本投入量反而会降低得率和纯度
	2.投入量过多	过多的样本会造成裂解、结合、洗脱不充分，抑制物含量增加
	3.吸附柱堵塞	见“吸附柱堵塞”一行
	4.盐离子残留	1) 进行Buffer RW2漂洗两次； 2) 加入Buffer RW2时可沿吸附柱管壁四周加入； 3) 加入Buffer RW2后，颠倒混匀2 - 3次； 4) 加入Buffer RW2后，静置5 min，然后离心；
	5.乙醇残留	进行空离2 min，将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干，小心从收集管上取下吸附柱，避免接触乙醇
gDNA污染	1.样本投入量过高	不同样本DNA/RNA含量相差大，投入量请勿超过20 mg组织和 5×10^6 细胞；肝、脾和肾DNA含量丰富，请勿超过10 mg。若需进一步去除gDNA残留，可使用DNase I进行消化
	2.未使用gDNA-Filter Columns A	使用gDNA-Filter Columns A

RNA降解	1.样本保存不当	1) 采用新鲜或-80℃保存未冻融的样本，避免反复冻融 2) 收集样本后迅速放入液氮中冷冻，然后转移至-80℃冰箱
	2.样本操作过程中污染	注意操作环境和实验器具的灭菌处理，避免引入外源RNase，见说明书“实验前准备及重要注意事项”
	3.样本反复冻融	避免样本反复冻融，分装保存
	4.匀浆裂解问题	样本充分裂解后，内源性核酸酶才能被灭活；样本勿室温解冻，在解冻前即在Buffer RLN中匀浆或者加入液氮研磨
	5.样本投入量过高	裂解液无法灭活所有的RNA酶以及裂解不充分；减少样本投入量
	6.电泳问题	1) 将电泳槽用3%双氧水浸泡20 min，然后用RNase-free ddH ₂ O进行冲洗； 2) 电泳液用RNase-free ddH ₂ O配置； 3) 更换新的样本上样缓冲液（即loading）； 4) 缩短电泳时间； 5) 将电泳液预冷、在电泳液中加入冰袋或者使用恒温电泳系统；
	7. RNase-Free Water被污染	RNase-Free Water不含防腐剂，室温保存或操作时可能引入微生物污染，可更换新的RNase-Free Water
抑制下游实验	1.盐离子残留	1) 进行Buffer RW2漂洗两次； 2) 加入Buffer RW2时可沿吸附柱管壁四周加入； 3) 加入Buffer RW2后，颠倒混匀2 - 3次； 4) 加入Buffer RW2后，静置5 min，然后离心；
	2.乙醇残留	进行空离2 min，将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干，小心从收集管上取下吸附柱，避免接触乙醇