

Tissue&Cell RNA Kit (gDNA-Filter)

组织/细胞 RNA 提取试剂盒 (gDNA 清除柱)

GenCell
Version 09/22

目录号: 7050

保存条件

15-30 常温保存。

产品组分

组分	规格
Buffer RL	30ml
70%乙醇	(使用前按瓶上标签加入无水乙醇) 9 ml
Buffer RW1	25 ml
Buffer RW2 (concentrate)	(使用前按瓶上标签加入无水乙醇) 13ml
RNase-free H ₂ O	10ml
gDNA-Filter Columns with Collection Tubes	50
Spin Columns RA with Collection Tubes	50

产品介绍

独特的裂解液迅速裂解细胞并灭活细胞 RNA 酶, 使用 gDNA-Filter Columns 去除基因组 DNA, 乙醇调节结合条件后, RNA 吸附于硅基质膜上, 再通过两步漂洗, 将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。提取的 RNA 纯度极高, 质量稳定可靠, 可直接用于 RT-PCR、芯片分析、分子克隆等多种下游实验。

注意事项

1. 提取的样品避免反复冻融, 否则影响 RNA 提取得率和质量。
2. 低温时如果 Buffer RL 产生沉淀, 请水浴加热使其溶解后使用。
3. 基因组清除柱 gDNA-Filter Columns 可以去除绝大部分 DNA 污染, 纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase 处理即可用于下游操作。
4. 第一次使用 70%乙醇和 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。

操作步骤 (以下所有离心步骤均在室温下进行)

1. 样本处理

动物组织

① 电动匀浆: 将新鲜组织迅速剪成小碎块, 加入 350 μ l (< 20 mg 组织) 或者 600 μ l (20 mg-30 mg 组织) 的 Buffer RL, 用电动匀浆器迅速彻底匀浆 30 s。

② 液氮研磨：液氮中研磨组织成细粉，取 20 mg/30 mg 细粉立即转移至装有 350 μ l/600 μ l Buffer RL 的 1.5 ml 离心管中，反复吸打匀浆（不要有组织团块），涡旋震荡 20 s。

③ 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 2 min，沉淀不能裂解的组织碎片，吸取上清进行步骤 2。

培养细胞

① 收集 < 10⁷ 悬浮细胞，12,000 rpm 离心 30 s（或者 300 g 离心 5 min），使细胞沉淀下来，吸弃上清，留下细胞团，充分振荡将细胞沉淀完全松散重悬。

注意：a) 对于单层贴壁细胞，孔板培养细胞可以直接在培养容器中裂解，细胞瓶培养的贴壁细胞通常先用胰蛋白酶消化后离心收集。b) 收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净，否则会稀释裂解液导致产量纯度降低。

② 加入适量裂解液 Buffer RL（见下表），涡旋振荡 20 s 至细胞团溶解消失，充分裂解。

注意：RNA 在 Buffer RL 中不会被 RNase 降解，如果细胞在加入 Buffer RL 裂解后不立即提取，可存放于 -80 $^{\circ}$ C 一个月以上（注意正确操作是细胞充分裂解之后再冻存）。

细胞数量	培养器皿直径 (cm)	Buffer RL 加入量 (μ l)
< 5 \times 10 ⁶	< 6	350
5 \times 10 ⁶ -1 \times 10 ⁷	6-10	600

2. 将上清液或裂解混合物转移到已装入收集管的 gDNA 清除柱 (gDNA-Filter Columns) 中，12,000 rpm 离心 2 min，弃掉 gDNA-Filter Columns，保留滤液 (RNA 在滤液中)。

3. 加入与滤液等体积的 70%乙醇（通常为 350 μ l 或 600 μ l，使用前检查是否加入无水乙醇），反复吸打充分混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns RA) 中，若一次不能将全部溶液加入吸附柱中，请分两次转入。12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。

4. 向吸附柱 RA 中加入 500 μ l Buffer RW1，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

5. 向吸附柱 RA 中加入 600 μ l Buffer RW2（使用前检查是否加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

6. 重复步骤 5。

7. 将吸附柱放回空收集管内，12,000 rpm 离心 2 min，弃收集管。

注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

8. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 30-50 μ l RNase-Free H₂O，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液，-70 $^{\circ}$ C 保存。

注意：RNase-Free H₂O 体积不应少于 30 μ l，体积过小影响回收效率。