版本号：FRI1928

FinePure Tissue/Cell RNA Kit

FinePure 动物组织细胞总 RNA 提取试剂盒

(离心柱型)

目录号：FR204

产品内容：

Contents	FR204 (50 preps)
DNase I (2,000 U)	1 瓶
DNase I Buffer	4 ml
RNase Free ddH_2O（管装）	1 ml
Proteinase K	1.2 ml
RNAstore Reagent	100 ml
Buffer RBL	30 ml
Buffer RLT	30 ml
Buffer RW	40 ml
Buffer RW2	12 ml
RNase Free ddH_2O	15 ml
RNAPure Spin Columns	50 个
2 ml Collection Tubes	50 个
1.5 ml RNase Free Microcentrifuge Tubes	50 个

储存条件：

本试剂盒中的 DNase Ⅰ组分采用冰袋运输，收到后立即将 DNase Ⅰ置于 2-8˚C保存，其他试剂室温(15-25˚C)保存。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品简介：

本试剂盒采用了独特的裂解系统，适合从动物组织中提取总RNA。使用本试剂盒可以有效提取分子量大于 200 nt 的 RNA。本试剂盒具有安全、高效、快速、方便的特点，提取过程中无需苯酚和氯仿等有毒有害试剂，也无需苯酚氯仿等抽提步骤。利用该试剂盒提取的RNA纯度高，极少含蛋白质、基因组DNA 和其它杂质的污染。提取得到的RNA可以直接用于Northern 杂交、斑点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RNA 分解酶的保护分析、RT-PCR、Real Time RT-PCR、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

注意事项：

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1．操作前在 RLT 中加入 β-巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml RLT 中加入 10 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT 4℃可放置一个月，Buffer RLT 在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。

2．尽可能使用新鲜收集的样品，RNA 产量与起始样品中 RNA 的完整性有关，按照说明书标准流程降解为小片段的 RNA 不能被有效回收。

3．如需提取包含 Small RNA (<200 nt)的 RNA，可以联系 GENFINE 获得相应的提取流程。

DNase I母液的配制：

先用 1 ml 注射器吸取 550 μl RNase Free ddH_2O，然后打进装有 DNase I 干粉（2,000 U）的玻璃瓶中，轻柔混匀，分装后-20℃贮存（可保存 9 个月）。**(如果需要另外购买 DNase I，目录号：RA102-01)** 。

注意：从-20℃融化后的DNase I母液保存于4℃ (可保存6周)，不要再次冻存。

提取步骤：

一、从动物组织中提取总 RNA

使用前请先在 Buffer RW2 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 RNAPure Spin Columns 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μl Buffer RBL，12,000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）

2. 匀浆处理：

将 RNAstore Reagent 保存或新鲜的组织样品迅速转移至用液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状（无明显的可见颗粒，如果没有研磨彻底会影响 RNA 的收率和质量）。将研磨成粉末状的样品（10-20 mg）加入到含有 300 μl Buffer RLT（使用前请先检查是否已加入 β-巯基乙醇）的 1.5 ml 灭菌离心管中，立即涡旋剧烈震荡混匀直至裂解液中无明显沉淀。随后向组织匀浆液中加入 590 μl RNase Free ddH_2O 和 20 μl Proteinase K，混匀后 56°C 孵育 10-20 min。

注意：也可将 10-20 mg RNAstore Reagent 保存或新鲜的组织加 300 μl Buffer RLT，用电动或玻璃匀浆器彻底研磨。组织量一定不能超过 20 mg，否则将导致 RNA 得率和纯度下降。

3. 12,000 rpm 离心 2 min，将上清转移至另一离心管中。
4. 缓慢加入 0.5 倍滤液体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 RNAPure Spin Columns **(吸附柱放在收集管中)**，12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
5. 向吸附柱中加入 350 μl Buffer RW，12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
6. DNase I 工作液的配制：取 10 μl DNase I 母液放入新的 RNase Free 离心管中，加入 70 μl DNase I Buffer，轻柔混匀。（DNase I 母液的配制：将 DNase I 干粉（2,000 U）溶解在 550 μl RNase Free ddH_2O 中，轻柔混匀，分装后-20°C贮存（可保存 9 个月）。）

   注意：解冻后的 DNase I 储存液保存于 4°C（可保存 6 周），避免反复冻融。
7. 向吸附柱中央加入 80 μl 的 DNase I 工作液，室温放置 15 min。
8. 向吸附柱中加入 350 μl Buffer RW，12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
9. 向吸附柱中加入 500 μl Buffer RW2 **（使用前请先检查是否已加入乙醇）**，12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
10. 重复步骤 9 一次。
11. 12,000 rpm 离心 3 min，将吸附柱放入一个新的 1.5 ml RNase Free Microcentrifuge Tubes 中，向吸附膜中央加入 50-100 μl RNase Free ddH_2O，室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液。

二、从培养细胞中提取总 RNA

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 RNAPure Spin Columns 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 µl Buffer RBL，12,000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）
2. 匀浆处理
   a) 贴壁细胞：彻底吸弃培养液，每6-10 cm^2面积加入 600 µl Buffer RLT，用移液器吹打3-5次使细胞裂解。
   b) 细胞悬液：500 x g 离心收集细，每5×10^6-1×10^7细胞加入 600 µl Buffer RLT，少于5×10^6细胞加入 350 µl Buffer RLT，用移液器吹打3-5次使细胞裂解。
3. 将所有溶液转移至过滤柱FinePure Filtration Column（过滤柱放在收集管中），12,000 rpm离心 2 min，小心吸取收集管中的滤液至新的 1.5 ml RNase Free离心管中，吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。
4. 缓慢加入 0.5 倍滤液体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 RNAPure Spin Columns (吸附柱放在收集管中)，12,000 rpm离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
5. 向吸附柱中加入 350 µl Buffer RW，12,000 rpm离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
6. DNase I 工作液的配制：取 10 µl DNase I 母液放入新的 RNase Free离心管中，加入 70 µl DNase I Buffer，轻柔混匀。（DNase I 母液的配制：将 DNase I 干粉（2,000 U）溶解在 550 µl RNase Free ddH_2O中，轻柔混匀，分装后 -20℃贮存（可保存 9 个月）。）**注意：解冻后的 DNase I母液保存于 4℃（可保存 6 周），避免反复冻融。**
7. 向吸附柱中央加入 80 µl 的DNase I 工作液，室温放置15 min。
8. 向吸附柱中加入 350 µl Buffer RW，12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
9. 向吸附柱中加入 500 µl Buffer RW2（**使用前请先检查是否已加入乙醇**），12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
10. 重复操作步骤 9 一次。
11. 12,000 rpm 离心 3 min，将吸附柱放入一个新的 1.5 ml RNase Free离心管中，向吸附膜中央加入 50-100 µl RNase Free ddH_2O，室温放置1 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液。