

## Total RNA Extraction Mini Kit

### 总 RNA 小提试剂盒

本产品适合于从 $\leq 1 \times 10^7$  个培养细胞、 $\leq 30\text{mg}$  动物软组织(肝脏、脾脏、肾脏, 脑等)、 $\leq 100\text{mg}$  常规的植物/真菌组织样品中提取总 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术, 提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提, 整个提取过程只需 20~30 分钟。试剂盒采用 DNA 过滤技术, 可高效地过滤去除 DNA。

### 产品组份

产品编号	RNT412-01	RNT412-02	RNT412-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
NA Extraction Mini Columns	20	100	500
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer PL	8 ml	30 ml	150 ml
Buffer W1R	10 ml	40 ml	150 ml
Buffer W2R*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.5 ml	10 ml	60 ml

### 保存条件

本产品可在室温( $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ )保存 12 个月。因 RNase Free Water 不含抑菌剂, 室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。推荐分装并保存于  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ , 以减少污染。

### 准备事项

- Buffer W2R 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

## 实验步骤

### 样品前处理

1. **A.** 称取 10~20mg 组织样品，液氮研磨或选择合适的工具进行匀浆，加入 500 $\mu$ l Buffer PL，高速涡旋 20~60 秒打散样品，室温放置 5 分钟，14,000 x g 离心 5 分钟。

样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器、珠磨仪等工具进行匀浆。之后 14,000 x g 离心 5 分钟。按第 2 步进行操作。

- B.** 取  $10^6$  细胞沉淀，加入 500 $\mu$ l Buffer PL，涡旋或用移液枪吸打打散细胞，室温放置 5 分钟。

若样品为白细胞沉淀，分离得到白细胞沉淀的血液用量应少于 1.5ml。

- C.** 取植物样品液氮研磨，称取 30-100mg 样品至 2ml 离心管中，加入 500 $\mu$ l Buffer PL，涡旋混匀，室温放置 5 分钟，14,000 x g 离心 5 分钟。

2. 把 NA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。把第 1 步的上清液转移至过滤柱中。14,000 x g 离心 2 分钟，弃去柱子，保留滤液。

3. 加入 0.5 倍体积无水乙醇(~250 $\mu$ l)至滤液中，用移液枪吸打 3~5 次充分混匀。

对于脂质等杂质含量高的样品加入等倍 70%乙醇代替 0.5 倍无水乙醇至滤液中可提高产量。

### 过柱纯化 RNA

1. 把新的 NA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq$ 750 $\mu$ l 混合液至柱子中。12,000 x g 离心 30 秒。
2. (若混合液超过 750 $\mu$ l) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子。12,000 x g 离心 30 秒。
3. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer W1R 至柱子上。13,000 x g 离心 10 秒。
4. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 $\mu$ l Buffer W2R 至柱子中，13,000 x g 离心 10 秒。

5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 $\mu$ l Buffer W2R 至柱子中，13,000  $\times$  g 离心 10 秒。

6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟。

该步骤去除 RNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50 $\mu$ l 时，该步骤结束后应打开 RNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

7. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~100 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

柱子最小的洗脱体积是 30 $\mu$ l，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

8. 弃去柱子，把 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量，超量样品反而会降低产量和纯度。由于样品的复杂性，降低样品量至 10mg。
- **富含多糖类样品：**降低样品量至 10mg。
- **裂解液离心不充分：**加大裂解液的用量，延长裂解液的离心时间以去除高分子量杂质。

### 2. RNA 产量低

- **洗脱不充分：** RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置 2 分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。
- 

### 3. RNA 降解

- **RNase Free Water 被污染：** RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的 RNase Free Water 或 DEPC 处理水。
- **样品贮藏问题：**反复解冻会引起 RNA 降解，确保样品解冻次数不要超过 2 次。
- **裂解问题：**液氮研磨后不要让样品解冻，快速加入裂解液并立即打散样品。样品只能充分裂解打散后，内源的核酸酶才能被灭活，RNA 才不会降解。
- **电泳原因：**常见的 RNA 降解现象都是电泳过程中引起的。更换新的 Loading Buffer 和电泳缓冲液。