

SteadyPure 快速RNA提取试剂盒

SteadyPure Quick RNA Extraction Kit

Code No. AG21023

包装量: 50 rxns
保存温度: 室温 (15 ~ 25°C)

> 产品概述

本产品可快速从 $\leq 1.0E+07$ 个培养细胞 (HL60、293T 等) 和 ≤ 10 mg 组织样本 (心脏、肝脏、肾脏、脑、胃等) 中提取总RNA。试剂盒采用独特的裂解系统, 无需酚氯仿抽提, 能在快速裂解细胞或组织的同时抑制核酸酶的作用, 保持RNA的完整性, 具有操作简单快速、纯度好、收量高等优点。纯化获得的 Total RNA 可以直接用于 RT-qPCR、RT-PCR、Northern 杂交、mRNA 纯化、体外翻译等各种分子生物学实验。

> 安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂, 实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套, 然后再进行实验操作。

注意: 使用后溶液需要收集在废液桶中专门处理。

如果 Buffer QLS 或 Buffer QWB 不小心溅到皮肤表面, 请立刻擦拭并用清水冲洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

> 产品组成

Buffer QLS	30 ml
Buffer QWB*1	15 ml
RNase Free Water*2	10 ml
Quick RNA Mini Columns	50 sets
Collection tubes	50 pcs
RNase Free Tubes*3	50 pcs

*1: Buffer QWB 在首次使用前, 请添加 35 ml 的 100% 乙醇 (Buffer QWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7), 混合均匀后在瓶子上做好标记, 室温下保存。

*2: RNase Free Water 开启后建议保存于 -20°C 。

*3: 本产品中提供的 RNase Free Tubes 仅用于洗脱 RNA, 前期裂解所用离心管需自备。

> 实验前准备

1. 自备: 无水乙醇、PBS 缓冲液、1.5 ml 离心管 (RNase free)。
2. Buffer QLS 若出现沉淀, 请于 $50 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 加热溶解, 待溶液恢复至室温后使用。
3. Buffer QWB 在首次使用前, 请添加 35 ml 的 100% 乙醇 (Buffer QWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7), 混合均匀后在瓶子上做好标记, 室温下保存。

> 保存及运输

保存温度: 室温 (15 ~ 25°C) 保存

运输温度: 室温 (15 ~ 25°C) 运输

> 注意事项

1. 应尽量使用新鲜的实验材料, 以确保提取的 RNA 不被降解。
2. 如使用液氮研磨组织材料时, 应随时加入液氮, 以确保提取的 RNA 不被降解; 如使用组织研磨仪, 应注意低温研磨及确保研磨充分。
3. 本产品说明书推荐的最适上样量能满足大部分的样本, 但对于核酸含量过高或核酸含量过低的样本, 可根据需要减少或增加样本起始量。
4. RNA 提取过程必须在室温进行, 不可置于冰上, 直至洗脱离心后得到 RNA 方可放在冰上, 以避免期间产生不溶物堵塞RNA纯化柱。
5. 样本需要充分裂解, 否则可能会堵塞 Quick RNA Mini Columns, 影响RNA收量及纯度。如果样本量较大, 请适当增加试剂用量并使用多个 Quick RNA Mini Columns 进行纯化操作。

6. 不同样本充分裂解的时间可能存在差异，一般情况下，高速振荡混匀或用移液器反复吹打 30 s ~ 2 min 可充分裂解，若样本仍呈粘稠状，可适当延长裂解时间。
7. *Quick RNA* Mini Columns 的最大容积为 700 μ l，使用时如果液体的体积超出最大容积，请分批加入。
8. 操作过程中，应预防 RNase 污染，需注意以下几方面：
 - ① 使用 RNA 操作专用实验台，经常更换新手套，穿戴 RNA 专用实验服，实验过程中尽量不要说话及来回走动，操作过程中避免物品从离心管上方过。
 - ② 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂等的 RNase 污染。

➤ 操作流程

裂解步骤：

不同的样本，请选择不同的裂解步骤进行操作。如处理样本增大或处理样本核酸含量过高，可按比例增加裂解液体积，并使用多个 *Quick RNA* Mini Columns 进行纯化操作。

悬浮细胞的裂解：

1. 8,000 \times g 4°C 离心 2 min，将 $\leq 1.0E + 07$ 个悬浮细胞收集至离心管底部，弃上清。
2. 使用 1X PBS 缓冲液清洗一次，8,000 \times g 4°C 离心 2 min，弃上清。
3. 向上述收集了细胞的离心管中加入 500 μ l Buffer QLS 裂解液。
4. 立即高速振荡混匀或用移液器反复吹打 30 s ~ 2 min，直至匀浆液清亮且不粘稠。

【注：一般情况下，高速振荡混匀或用移液器反复吹打 30 s ~ 2 min 可充分裂解，若样本仍呈粘稠状，可适当延长裂解时间。】

5. 匀浆液室温静置 2 min。

贴壁细胞的裂解：

1. 从培养皿中吸出培养液，用 1X PBS 缓冲液清洗细胞一次。
2. 吸出 PBS 缓冲液，向 $\leq 1.0E + 07$ 个培养细胞中加入 500 μ l 的 Buffer QLS 裂解液，轻摇培养皿，确保 Buffer QLS 溶液均匀分布于细胞表面。

【注：对于贴壁牢固的培养细胞可用细胞刮勺剥离细胞，需快速处理，立即进行后续操作。】

3. 使用移液器反复吹打使细胞脱落，然后将含细胞的匀浆液全量转移至离心管中，高速振荡混匀或用移液器吹打 30 s ~ 2 min，直至匀浆液清亮且不粘稠。

【注：一般情况下，高速振荡混匀或用移液器反复吹打 30 s ~ 2 min 可充分裂解，若样本仍呈粘稠状，可适当延长裂解时间。】

4. 匀浆液室温静置 2 min。

组织样本的裂解：液氮研磨

1. 将适量新鲜或 -80°C 冻存的组织样品转移至液氮预冷的研钵中，用研磨杵研磨组织样本（研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮），直至研磨成粉末状（无明显可见颗粒，研磨不充分会影响 RNA 的收量）。
2. 取 ≤ 10 mg 的上述已研磨成粉末状的组织样本转移至含有 300 μ l Buffer QLS 裂解液的 1.5 ml 离心管（RNase free）中，立即高速振荡混匀或用移液器反复吹打 3 ~ 5 min，直至无明显组织沉淀，样本充分裂解后，如残留未裂解的沉淀物质可通过后续离心去除。

【注：一般情况下，高速振荡混匀或用移液器反复吹打 3 ~ 5 min 可充分裂解，若仍有明显沉淀，可适当延长裂解时间。】

3. 12,000 rpm，4°C 离心 5 min。

4. 小心吸取上清液至新的 1.5 ml 离心管（RNase free）。

组织样本的裂解：研磨棒或组织研磨仪

1. 将 ≤ 10 mg 的新鲜或 -80°C 冻存的组织样品转移至含有 300 μ l Buffer QLS 裂解液的 1.5 ml 离心管（RNase free）或研磨管中，用研磨棒或组织研磨仪研磨 3 ~ 5 min，直至无明显组织沉淀，研磨充分后，匀浆液如不足 300 μ l，用 Buffer QLS 裂解液补足 300 μ l，振荡混匀。样本充分裂解后，如残留未裂解的沉淀物质可通过后续离心去除。

【注：一般情况下，高速振荡混匀或用移液器反复吹打 3 ~ 5 min 可充分裂解，若仍有明显沉淀，可适当延长裂解时间。】

2. 12,000 rpm，4°C 离心 5 min。

3. 小心吸取上清液至新的 1.5 ml 离心管（RNase free）。

纯化步骤:

1. 向上述匀浆液中加入等体积的 100% 乙醇，用移液器吹打混匀，若出现明显粘稠物或沉淀，用移液器吹打多次，打散沉淀。

【注：若沉淀不散会导致 Quick RNA Mini Columns 堵塞，影响收量及纯度。】

2. 立即将上述混合液全部转移至 Quick RNA Mini Columns 中，12,000 rpm 室温离心 2 min，弃滤液。
3. 如需要 DNA 酶消化，请按照下述**可选步骤**进行。如不需要，请按照下述步骤继续进行。



Quick RNA Mini Columns 吸附 RNA
离心、去滤液

4. 向 Quick RNA Mini Columns 中加入 700 μ l 的 Buffer QWB，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。

【注：请确认 Buffer QWB 中已经加入了指定体积的 100% 乙醇。】

5. 将 Quick RNA Mini Columns 吸附柱安置于新的 2.0 ml Collection Tube 上，12,000 rpm 室温离心 2 min。

【注：此步骤需竖直将吸附柱取出，避免吸附柱柱头触碰收集管壁；安装于新的 2.0 ml Collection Tubes 上有利于提高 RNA 纯度。】



700 μ l Buffer QWB 洗 1 次
空管离心 2 min

6. 将 Quick RNA Mini Columns 吸附柱安置于新的 RNase Free Tube 上，在吸附柱膜的中央处加入 30 μ l ~ 200 μ l RNase Free Water，室温静置 3 min，然后 12,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱 RNA，将洗脱得到的 RNA 放入 -80°C 中保存。

【注：RNase Free Water 的添加量可根据实际需求的 RNA 浓度调整，若需求较高浓度的 RNA，可适当降低 RNase Free Water 的添加量（例：30 ~ 60 μ l）。】



30 μ l ~ 200 μ l
RNase Free Water 洗脱

可选步骤：DNase I 消化，可选择本公司产品 DNase I (RNase Free) (Code: AG12001)：

- ① 按下表配制 DNase I 反应液并混匀。把 50 μ l DNase I 反应液加到 Quick RNA Mini Columns 的膜中央，室温静置 15 min。

成分	用量
DNase I (RNase free) (5 U/ μ l)	4 μ l
10X DNase I Buffer	5 μ l
RNase free water	41 μ l

- ② 后续实验，请按照上述纯化步骤 4 ~ 6 操作。

