

Flying Shark[®] Plus Tissue&Cell RNA/DNA Kit

组织/细胞 RNA/DNA 分提试剂盒

目录号

RNE13 (50 preps)

试剂盒组成

Component	RNE13 (50 preps)
Buffer RL	30 ml
70%乙醇	9 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
Buffer WB1	30 ml
Buffer RW1	30 ml
Buffer RW2 (concentrate)	25 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
RNase-free H ₂ O	10 ml
Spin Columns AC with Collection Tubes	50
Spin Columns RA with Collection Tubes	50
Collection Tubes	50

保存方法

室温 (15-30°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。

产品介绍

本试剂盒用于从同一个动物细胞或组织样品中同时分离提取基因组 DNA 和总 RNA，独特的裂解液迅速裂解细胞并灭活细胞 RNA 酶，使用 Spin Columns AC 吸附基因组 DNA 而 RNA 穿透滤过，Spin Columns AC 上的 DNA 经过一系列漂洗离心后洗脱得到纯净基因组 DNA。滤过的 RNA 用 70%乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下特异性吸附于硅基质膜，再通过两步漂洗步骤，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/DNA 纯度高，质量稳定可靠，可直接应用于下 PCR、RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot 和体外翻译等实验。

适用范围

适用于快速从同一个动物细胞或组织样品中同时分离提取基因组 DNA 和总 RNA，不需要使用 DNase 消化，RNA 可直接用于反转录 PCR，荧光定量 PCR。

注意事项

1. 使用 RNase-free 的离心管和吸头；避开经常使用 RNase 的区域，以免 RNase 气溶胶污染。
2. 提取的样品避免反复冻融，否则影响 RNA 提取得率和质量。
3. 低温时如果 Buffer RL 产生沉淀，请水浴加热使其溶解后使用。
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（例如鼠肝脑）

- a) **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。

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。

- b) 将匀浆液 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 2 min，沉淀不能裂解的碎片或者不溶物，吸取上清液进行步骤 2。

培养细胞

- a) 收集 $<10^7$ 悬浮细胞至 1.5 ml 离心管，12,000 rpm 离心 10 s（或者 300 g 离心 5 min），使细胞沉淀下来，完全吸弃上清，留下细胞团，轻弹管壁将细胞沉淀完全松散重悬。
注意: 1) 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。2) 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。

- b) 加入适量裂解液 Buffer RL（见下表），反复吸打混至细胞团溶解消失，涡旋震荡 20 s，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°C 。

细胞数量	培养器皿直径 (cm)	Buffer RL 加入量 (μl)
$<5 \times 10^6$	<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 DNA 吸附柱 (Spin Columns AC) 中, 12,000 rpm 离心 1 min, 保留滤液 (RNA 在滤液中) 进行 RNA 提取步骤, DNA 吸附柱 AC 放入新的收集管 (Collection Tubes, 已提供) 中进行 DNA 提取步骤。

注意：如果裂解物黏稠导致柱子堵塞, 可提高离心力并延长离心时间, 使液体全部滤过去。

以下步骤 3-8 为 RNA 提取：

3. 加入与滤液等体积的 70% 乙醇 (请先检查是否已加入无水乙醇!), 反复吸打混匀 (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 μl Buffer RW1, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
5. 向吸附柱 RA 中加入 600 μl Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
6. 重复步骤 5。
7. 将吸附柱 RA 放回空收集管内, 12,000 rpm 离心 2 min。
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 μl RNase-Free H_2O , 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 得到 RNA 溶液, -70°C 保存, 防止降解。
注意：RNase-Free H_2O 体积不应少于 30 μl , 体积小影响回收效率。如果要提高 RNA 的产量, 可用 30-50 μl 新的 RNase-Free H_2O 重复步骤 8; 如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 8。

以下步骤 9-13 为 DNA 提取：

9. 向 DNA 吸附柱 AC 中加入 500 μl Buffer WB1, 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
10. 加入 600 μl Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

-
11. 重复步骤 10。
 12. 将吸附柱 AC 放回空收集管内，12,000 rpm 离心 2 min。
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）。
 13. 吸附柱 AC 放入新的离心管中，在吸附膜的中间部位悬空滴加 50-100 μ l RNase-Free H_2O ，室温放置 3-5 min，12,000 rpm 离心 1 min，收集 DNA 溶液。
注意：如果要提高 DNA 的浓度，可将第一次的洗脱液加回到吸附膜重复离心洗脱一遍。
-