

## GF-1 总 RNA 提取试剂盒说明书

版本 3.1

## 产品简介

GF-1 总 RNA 提取试剂盒用于从不同样本，如动物组织，细菌细胞，细胞培养液等中提取总 RNA（长度大于 200 碱基）。在一种特殊配制的灭活细胞 RNA 酶的缓冲液中对样品进行裂解。同时，样品通过加到一个特殊设计的均化柱后，DNA 片段被简单地去除，随后通过 DNA 酶 I 处理。加入优化的缓冲液和乙醇，可选择性地将 RNA 结合到柱子上，污染物被有效地洗涤。优质的 RNA 在无 RNase 水中洗脱。提取的 RNA 备用于下游应用，如去磷酸化，激酶，杂交，cDNA 的合成等。

## 试剂盒组成成份

	5 次	25 次	100 次	200 次
产品目录号	样品	CN/GF-TR-025	CN/GF-TR-100	CN/GF-TR-200
<b>组份</b>				
RNA 吸附柱 (RNA binding columns)	5	25	100	200
均化柱(Homogenization columns)	5	25	100	200
收集管 (Collection tubes)	10	50	200	400
缓冲液 TR* (Buffer TR*)	4ml	20ml	80ml	2 x 80ml
抑制剂去除缓冲液* (Inhibitor Removal Buffer*)	1.5ml	8ml	30ml	2 x 30ml
洗涤液* (Wash Buffer*)	3ml	15ml	2 x 30ml	4 x 30ml
DNA 酶 I* (DNase I*)	0.04ml	0.2ml	0.8ml	2 x 0.8ml
消化缓冲液 (Digestion Buffer)	0.35ml	2ml	8ml	16ml
消化增强剂 (Digestion Enhancer)	0.04ml	0.2ml	0.8ml	1.6ml
无 RNA 酶水 (RNase-free Water)	1ml	5ml	20ml	40ml
蛋白酶 K* (Proteinase K*)	0.06ml	0.3ml	1.1ml	2 x 1.1ml
使用说明 (Handbook)	1	1	1	1

注意：标\*的请参照配制方案以及其储存条件和稳定性。

GF-1 总 RNA 提取试剂盒有 25 次、100 次、200 次包装。本试剂盒仅供研究使用。

## 自备材料

80%乙醇

无水乙醇 (&gt;95%)

2-巯基乙醇

溶菌酶 (细菌 RNA 纯化)

溶细胞酶/消解酶 (酵母 RNA 纯化)

缓冲液 YL (1M 山梨醇, 1M EDTA)

## 配制方案

贴有抑制剂去除缓冲液和洗涤液标签的浓缩液，在使用前需用无水乙醇 (>95%) 稀释。

## 样品 (5 次):

在抑制剂去除缓冲液中加入 1.5ml 无水乙醇。

在洗涤液中加入 7ml 无水乙醇。

## CN/GF-TR-025 (25 次):

在抑制剂去除缓冲液中加入 8ml 无水乙醇。

在洗涤液中加入 35ml 无水乙醇。

## CN/GF-TR-100 (100 次):

在抑制剂去除缓冲液中加入 30ml 无水乙醇。

在洗涤液中加入 70ml 无水乙醇，使用完后再以同方式稀释第二瓶洗涤液。

## CN/GF-TR-200 (200 次):

在抑制剂去除缓冲液中加入 30ml 无水乙醇。

在洗涤液中加入 70ml 无水乙醇。使用完后再以同方式稀释第二瓶洗涤液。

抑制剂去除缓冲液和洗涤液使用后拧紧瓶盖，室温保存。

DNA 酶 I 对物理变性处理非常敏感，混匀时轻轻颠倒试管混匀，不能漩涡振荡。按 7ul 每支分装，避免反复冻融，-20℃ 保存。

## 储存及稳定性

- 所有溶液 (除 DNA 酶 I) 20 °C-30 °C 保存。
- 蛋白酶 K 和 DNA 酶 I -20 °C 保存。
- 加入 2-巯基乙醇的缓冲液 TR 能保存一个月 (根据需要准备)。
- 试剂盒各组份自生产之日起可稳定保存 12 个月。缓冲液 TR 和抑制剂去除缓冲液在室温过低时易出现结晶，使用前置于 55 °C-65 °C 环境中至晶体完全溶解。

## 化学危害

缓冲液 TR 和抑制剂去除缓冲液含有胍盐，当接触皮肤或吞服时可能造成危害。使用时一定要戴上手套并做好安全防护措施。不能将含有漂白剂或任何形式的酸性溶液加入到含有胍盐的提取废料中进行消毒。清洁沾染试剂的物品，不需要用漂白剂和酸性溶液清洗，只需浸泡在洗涤剂和水上来即可除去胍盐。

## 操作步骤

## 提示

- 所有操作均在室温下进行，除非另有说明。
- 样品体积不要超过推荐的最大体积，以防止降低产量和纯度。
- 在整个提取过程中需戴上手套，防止带入 RNA 酶。
- 使用前，1ml 缓冲液 TR 中加入 10ul 2-巯基乙醇，加入 2-巯基乙醇的缓冲液 TR 能保存一个月。
- DNA 酶 I 消化混合液的准备：

DNA 酶 I	7 μl
消化缓冲液	56 μl
消化增强剂	7 μl

轻轻吹打混匀 DNA 酶 I 消化混合液 (不能振荡混匀)。

将 DNA 酶 I 消化混合液保存在冰盒中备用。

## I 样品制备

## A、动物组织 (除骨骼组织)

注 1: 组织量不要超过 30mg。

注 2: 处理冷冻的动物组织时不能先行解冻。

注 3: 使用以下方法很难从骨骼组织，如心脏和肌肉组织中提取总 RNA，因此，根据动物组织 II (骨骼组织) 中所描述的方法来

## 提取心脏和肌肉组织中的总 RNA。

1、用预冷却的研钵和研棒将动物组织（不超过 30mg）在液氮中磨成精细粉末，将磨碎的组织放置到预冷却、无 RNA 酶的合适尺寸的容器中，为下一步实验提供均质化的样本。

**注：确保组织已磨成细粉，以获得高产量的 RNA。处理冷冻的动物组织时不能先行解冻。**

2、通过使用常规的均质器或其他合适的匀浆器使组织在 700  $\mu$ l 缓冲液 TR 中完全均质化。

**注：确保在使用前 2-巯基乙醇已加入到缓冲液 TR 中。**

3、以最大转速离心样本 3 分钟。

4、将裂解产物转移至带有收集管的均化柱中，以最大转速离心 2 分钟，保留通过离心柱的液体。

5、加入 650ul 80%乙醇至上述通过离心柱的液体中，反复吹打至完全混匀，无需离心。

**注：加入乙醇后可能产生沉淀。**

6、进行第二步：RNA 分离

### B、动物组织 II（骨骼组织）

**注 1：组织量不要超过 30mg。**

**注 2：处理冷冻的动物组织时不能先行解冻。**

1、用预冷却的研钵和研棒将动物组织（不超过 30mg）在液氮中磨成精细粉末，将磨碎的组织放置到预冷却、无 RNA 酶的合适尺寸的容器中，为下一步实验提供均质化的样本。

**注：确保组织已磨成细粉，以获得高产量的 RNA。处理冷冻的动物组织时不能先行解冻。**

2、通过使用常规的均质器或其他合适的匀浆器使组织在 300  $\mu$ l 缓冲液 TR 中完全均质化。

**注：确保在使用前 2-巯基乙醇已加入到缓冲液 TR 中。**

3、加入 590ul 水至裂解产物中，然后加入 10ul 蛋白酶 K 溶液，脉冲漩涡振荡，充分混匀，65 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。

4、以最大转速离心样本 3 分钟。

5、转移裂解产物（不要超过 650ul）至带有收集管的均化柱中，以最大转速离心 2 分钟，保留通过离心柱的液体。重复步骤 4 中剩余样本。

6、加入 450ul 无水乙醇至上述通过离心柱的液体中，反复吹打至充分混匀。

7、进行第二步：RNA 分离

### C、细菌细胞

**注 1：细菌数量不能超过  $1 \times 10^9$  个，将会超过柱子的装载量。**

**注 2：溶菌酶准备（用 TE 缓冲液按照以下推荐的浓度溶解溶菌酶，且在 TE 缓冲液中 PH8.0）**

对于革兰氏阴性菌，溶菌酶浓度 0.5mg/ml。

对于革兰氏阳性菌，溶菌酶浓度 5mg/ml。

1、将培养生长到对数期或是稳定期初期的细菌，在 4 $^{\circ}$ C 下 6,000 x g (8,500 rpm) 离心 5 分钟，完全弃去上清。

**注：细菌数量不能超过  $1 \times 10^9$  个。**

2、a) 对于革兰氏阴性菌，在菌体沉淀中加入 100ul 0.5mg/ml 溶菌酶，振荡混匀，使细菌重新悬浮，室温温育 3-5 分钟。

b) 对于革兰氏阳性菌，在菌体沉淀中加入 100ul 5mg/ml 溶菌酶，振荡混匀，使细菌重新悬浮，室温温育 5-10 分钟。

**注：确保溶菌酶是用 TE 缓冲液溶解。**

3、加入 350ul 缓冲液 TR。

**注：确保在使用前 2-巯基乙醇已加入到缓冲液 TR 中。**

4、将裂解产物转移至带有收集管的均化柱中，以最大转速离心 2 分钟，保留通过离心柱的液体。

5、加入 300ul 无水乙醇至上述通过离心柱的液体中，反复吹打至完全混匀，无需离心。

**注：加入乙醇后可能产生沉淀。**

6、进行第二步：RNA 分离

### D、细胞培养物

**注 1：细胞数量不能超过  $1 \times 10^7$  个，将会超过柱子的装载量。**

1、将细胞培养物放入微量离心管，1,000 x g (3,500 rpm) 离心 5 分钟。

**注：细胞数量不能超过  $1 \times 10^7$  个。**

2、加入 350ul 缓冲液 TR 到细胞沉淀中，用力漩涡振荡，充分混匀。

**注：确保在使用前 2-巯基乙醇已加入到缓冲液 TR 中。**

根据不同的细胞数，加入相应体积的缓冲液 TR：

a) 若细胞数  $< 5 \times 10^6$  个，加入 350ul 缓冲液 TR；

b) 若细胞数为  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  个，加入 700ul 缓冲液 TR。

3、将裂解产物转移至带有收集管的均化柱中，以最大转速离心 2 分钟，保留通过离心柱的液体。

4、加入等体积 80%乙醇（350ul 或 700ul）至上述通过离心柱的液体中，反复吹打至完全混匀，无需离心。

**注：加入乙醇后可能产生沉淀。**

5、进行第二步：RNA 分离

### E、植物组织

**注 1：组织量不要超过 100mg**

**注 2：处理冷冻组织时不能先行解冻。**

**注 3：某些植物组织带有高代谢产物，可能会在缓冲液 TR 中凝固，因此，建议用户使用缓冲液 HR（目录号：GFHR025），此缓冲液单独出售。**

1、用预冷却的研钵和研棒将植物组织（不超过 100mg）在液氮中磨成细粉末，将磨碎的组织放置到预冷却、无 RNA 酶的 2ml 微量离心管中。

**注：确保组织已磨成细粉，以获得高产量的 RNA。**

**处理冷冻组织时不能先行解冻。**

2、加入 400ul 缓冲液 TR 或缓冲液 HR（参照注 3）至磨碎的组织中，用力漩涡振荡，充分混匀。

**注：确保在使用前 2-巯基乙醇已加入到缓冲液 TR 中。**

3、以最大转速离心样本 3 分钟。

4、将裂解产物转移至带有收集管的均化柱中，以最大转速离心 2 分钟，保留通过离心柱的液体。

5、加入 350ul 80%乙醇至上述通过离心柱的液体中，反复吹打至完全混匀，无需离心。

**注：加入乙醇后可能产生沉淀。**

6、进行第二步：RNA 分离

### F、酵母菌

**注 1：仅使用新鲜收获的细胞。**

注 2: 细胞数量不能超过  $5 \times 10^7$  个, 将会超过柱子的装载量。

注 3: 使用时制备新鲜的缓冲液 YL (1M 山梨醇, 1M EDTA), 并加入 0.1% 2-巯基乙醇和溶细胞酶/消解酶 (每  $1 \times 10^7$  个细胞加 50U)

1、在 4℃ 下 5,000 x g (8,000 rpm) 离心酵母细胞 5 分钟, 完全弃去上清。

注: 酵母细胞数不能超过  $5 \times 10^7$  个。

2、加入 1.5ml 含有溶细胞酶/消解酶和 0.1% 2 巯基乙醇的缓冲液 YL (参照注 3) 使细胞重新悬浮, 30℃ 温育 30 分钟以产生原生质球。

注: 仅使用新鲜收获的细胞。

3、将产生的原生质球以 1,000 x g (3,500 rpm) 离心 5 分钟。

4、加入 350ul 缓冲液 TR 裂解原生质球, 用力漩涡振荡, 充分混匀。

注: 确保在使用前 2-巯基乙醇已加入到缓冲液 TR 中。

5、将裂解产物转移至带有收集管的均化柱中, 以最大转速离心 2 分钟, 保留通过离心柱的液体。

6、加入 350ul 80%乙醇至上述通过离心柱的液体中, 反复吹打至完全混匀, 无需离心。

注: 加入乙醇后可能产生沉淀。

7、进行第二步: RNA 分离

## II RNA 分离

1、将样品 (包括沉淀物) (不超过 650ul) 转移至带有收集管的 RNA 吸附柱中, 10,000 x g (11,000 rpm) 离心 1 分钟, 弃去废液。

2、加入 500ul 洗涤液, 以最大转速离心 1 分钟, 弃去废液。

3、吸取 70ul DNA 酶 I 消化混合液直接加至 RNA 吸附柱的膜中央, 室温温育 15 分钟。

注: 有些样本基因组 DNA 含量较高, 如有必要需延长温育时间 (需凭经验确定)。

4、加入 500ul 抑制剂去除缓冲液, 以最大转速离心 1 分钟, 弃去废液。

5、加入 500ul 洗涤液, 10,000 x g (11,000 rpm) 离心 1 分钟, 弃去废液。重复洗涤一次, 弃去废液。

6、10,000 x g (11,000 rpm) 离心柱子 1 分钟, 以除去残留缓冲液。

7、将 RNA 吸附柱放入一干净的微量离心管中, 取 40-60ul 无核酸酶水直接加到柱子的膜中央, 室温静置 1 分钟, 10,000 x g (11,000 rpm) 离心 1 分钟。RNA -20℃ 或 -80℃ 保存。

## 故障排除

不按照给定的说明进行操作将会出现不符合标准的结果, 将影响 RNA 的得率和质量, 如果出现此类问题, 请参照以下内容处理:

问题	可能的原因	建议
均化柱堵塞	样本裂解不足或均匀不充分	用研棒将组织研磨至细粉末。
		用匀浆器搅拌使组织均质化或者让匀浆通过 18-21 号针头数次, 直到看不到明显组织碎片。

问题	可能的原因	建议
均化柱堵塞	样品材料过多	使用新样本重新提取, 减少样品材料。
	裂解产物太粘稠	可以用裂解液再作稀释。
RNA 得率低	样品在通过 RNA 吸附柱之前没加入无水乙醇或 80% 乙醇	使用新样本重新提取。
	配制错误浓度的乙醇 (乙醇浓度不是 80%)	使用新样本重新提取。
	抑制剂去除缓冲液和洗涤液的浓缩液未稀释	请参照“配制方案”; 重新提取新样本。
RNA 降解或污染	样品处理不当	组织样本在使用前应立即保存于 -70℃ 液氮中。
		处理冷冻组织时不能先行解冻。
		使用一次性塑料耗材和吸头。
		确保在无 RNA 酶环境中操作。
基因组 DNA 污染	样品在通过 RNA 吸附柱之前没加入无水乙醇或 80% 乙醇	使用新样本重新提取。
	配制错误浓度的乙醇 (乙醇浓度不是 80%)	使用新样本重新提取。
	裂解产物在离心过程中没有通过均化柱	使用新样本重新提取。
	DNA 酶 I 处理不当	请参照 DNA 酶 I 消化混合液的制备方案并将 DNA 酶 I 消化混合液直接加至 RNA 吸附柱的膜中央。
洗脱的 RNA 在下游应用中性能差	洗脱下来的 RNA 含残留乙醇	确保在洗脱之前柱子已进行离心干燥。
	RNA 降解	请参照问题“RNA 降解或污染”。

## 上海凯斯泰尔生物科技有限公司

地址: 上海市浦东新区康新公路 3377 号 2 号楼 604 室

电话: 021-68060114

传真: 021-68060114

邮箱: info@kestrel-china.com

网址: www.kestrel-china.com

## Vivantis Technologies Sdn Bhd

1012 S.Coast Highway Suite 1,Oceanside CA 92054, USA.

Tel: +6 03 8025 1603

Fax: +6 03 8025 1637

Email: info@vivanttechnologies.com

international@vivanttechnologies.com

Web: www.vivanttechnologies.com