

YALEPIC[®] 动物细胞/组织总 RNA 快速提取试剂盒(不含 DNase I)

YALEPIC[®] Animal Cell & Tissue Total RNA Fast Isolation Kit(No DNase I)

产品货号: YR23017 (50T) ; (试) YR23017 (5T)

产品保存及运输条件:

常温运输; 10 ~ 30°C 室温保存一年。

产品概述

YALEPIC[®] Animal Cell & Tissue Total RNA Fast Isolation Kit (No DNase I) 基于异硫氰酸胍裂解与硅基质膜纯化相结合的技术, 适用于从动物组织、细胞中快速提取总 RNA。提取过程中无需使用氯仿, 采用硅基质膜吸附 RNA, 搭配优化后的缓冲液进行纯化, Fast gDNA Filter Columns 能有效地去除杂质和 gDNA, Pure Columns RT 能高效地结合 RNA。提取的总 RNA 纯度高, 如敏感实验需完全去除残留 DNA, 可用 RNase-free 的 DNase I 进行消化去除。提取的 RNA 可用于 RT-PCR、荧光定量 PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、Ploy (A) 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

产品组分

序号	产品组分	YR23017	(试) YR23017
①	YLC Buffer	37 ml	4 ml
②	Wash Buffer RA	42 ml	4.5 ml
③	Wash Buffer RB	12 ml	6 ml
④	RNase-free ddH ₂ O	11 ml	1 ml
⑤	Proteinase K	550 μl	60 μl
⑥	Fast gDNA Filter Columns with Collection tubes	50 T	5 T
⑦	Pure Columns RT with Collection tubes	50 T	5 T
⑧	Nuclease-free Centrifuge Tubes (1.5 ml) 赠	50 T	5 T

适用范围

动物组织: 10 ~ 30 mg

培养细胞: ≤ 1 × 10⁷ 个



自备试剂及仪器

无水乙醇 (提取 RNA 专用) ; 70% 乙醇 (RNase-free ddH₂O 配制) ; Nuclease-free 离心管; Nuclease-free 移液器吸头; 高速离心机; 恒温水浴锅; 涡旋振荡仪等。

实验准备及注意事项

1. 使用本试剂盒前做好防护措施, 穿戴实验服、手套、口罩等, 与常规 RNA 实验操作环境一致。
2. 使用 Nuclease-free 的移液器吸头和消耗品, 配制溶液应使用 RNase-free ddH₂O, 试剂使用完后立即盖好瓶盖, 避免交叉污染的风险。
3. 使用前请检查 **YLC Buffer** 中是否有晶体析出, 如有晶体析出, 可放置 56°C 水浴锅使晶体溶解, 混匀后放置室温使用。
4. 首次使用前, 向 **Wash Buffer RB** 中加入瓶标签指定体积的无水乙醇。试用装 (5T) 中 **Wash Buffer RB** 已含无水乙醇, 使用后请立即盖好瓶盖防止乙醇挥发。
5. 使用新鲜样本, 若不能及时提取, 将样本立即置于液氮中, 速冻后于 -85 ~ -65°C 保存, 并避免反复冻融。
6. 样本破碎需彻底, 否则会影响 RNA 的产量; 匀浆时尽量控制温度, 防止因高温导致的 RNA 降解。
7. 如需单独除去 DNA, 建议选用 RNase-free 的 **DNase I (YALI#YX27002)** 进行处理。

实验流程

● 样品处理

1. 动物组织

- 1) 匀浆处理: 取新鲜组织, 每 10 ~ 20 mg 加入 350 μ l **YLC Buffer**, 用电动匀浆器进行冰上进行匀浆, 直至无明显组织块即可, 加入 10 μ l **Proteinase K**, 涡旋混匀后室温静置 5 min。
- 2) 液氮研磨: 将组织在液氮中磨碎成粉末。每 10 ~ 20 mg 组织加 350 μ l **YLC Buffer**, 样品体积不超过总体积的十分之一, 涡旋振荡至无明显粉末团即可。加入 10 μ l **Proteinase K**, 涡旋混匀后室温静置 5 min。 (注: 匀浆完或者液氮研磨后的样本, 若不立即提取, 可置于 -85 ~ -65°C 保存)

2. 培养细胞

- 1) 贴壁细胞: 将细胞在培养瓶中直接裂解或处理成细胞悬液, 12,000 rpm 离心 1 min 弃上清, 得到细胞沉淀。每 6 ~ 10 cm² 培养面积加入 600 μ l **YLC Buffer**, 小于 6 cm² 加入 350 μ l **YLC Buffer**, 涡旋振荡使其充分裂解, 直至无明显细胞团即可。加入 10 μ l **Proteinase K**, 涡旋混匀后室温静置 5 min。
- 2) 细胞悬液: 12,000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 得到细胞沉淀。每 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 细胞加入 600 μ l **YLC Buffer**, 少于 5×10^6 细胞加入 350 μ l **YLC Buffer**, 涡旋振荡使其充分裂解, 直至无明显细胞团即可。加入 10 μ l **Proteinase K**, 涡旋混匀后室温静置 5 min。 (注: 应除尽细胞培养基, 使细胞充分悬浮并充分裂解, 避免影响 RNA 产量。细胞裂解后的样本, 若不立即提取, 可置于 -85 ~ -65°C 保存)



● RNA 提取

1. 样品充分裂解后, 12,000 rpm 离心 2 ~ 5 min。
2. 将上清液转移至已装入收集管的吸附柱 (**Fast gDNA Filter Columns with Collection tubes**) 中, 12,000 rpm 离心 30s, 弃掉 **Fast gDNA Filter Columns**, 收集滤液至一个新的 Nuclease-free 离心管 (自备)。
3. 缓慢加入与滤液等体积 (600 μ l 或 350 μ l) 的 70% 乙醇 (自备, RNase-free ddH₂O 配制), 混匀 (此时可能会出现沉淀)。
4. 将步骤 3 所得溶液和沉淀全部加入到已装入收集管的吸附柱 (**Pure Columns RT with Collection tubes**) 中, 若一次不能将全部溶液加入吸附柱中, 可分两次转入。12,000 rpm 离心 30 s, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。
5. 向吸附柱中加入 700 μ l **Wash Buffer RA**, 12,000 rpm 离心 30 s, 弃去收集管中废液, 将吸附柱放回收集管中。 (如下游实验对微量 DNA 敏感, 则建议用以下步骤替代步骤 5, 彻底去除微量 DNA)
 - *1) 向吸附柱中加入 350 μ l **Wash Buffer RA**, 12,000 rpm 离心 15 s, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
 - *2) 配制 DNase I (**YALI#YX27002**) 混合液: 取 52 μ l RNase-free ddH₂O, 向其中加入 20 μ l DNase I (1 U/ μ l) 及 8 μ l 10 \times DN Buffer, 混匀配制成终体积为 80 μ l 的反应液。如应用其他公司产品请参考相应说明书。
 - *3) 向吸附柱中加入 80 μ l 配制好的 DNase I 反应液, 20 ~ 30 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。
 - *4) 向吸附柱中加入 350 μ l **Wash Buffer RA**, 12,000 rpm 离心 15 s, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
6. 向吸附柱中加入 500 μ l **Wash Buffer RB** (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30 s, 弃去收集管中废液, 将吸附柱放回收集管中。重复该步骤一次。
7. 12,000 rpm 离心 2 min, 弃去收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。 (注: 乙醇残留会影响后续的酶促反应, 应将吸附柱中残余的乙醇彻底去除)
8. 将吸附柱置于一个新的 **Nuclease-free Centrifuge Tubes (1.5 ml)** 中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 30 ~ 50 μ l **RNase-free ddH₂O**, 室温放置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集 RNA 溶液, 提取的 RNA 可直接用于下游实验或于 -85 ~ -65 $^{\circ}$ C 保存, 防止降解。

注:

- 1) RNase-free ddH₂O 体积不应小于 30 μ l, 体积过小影响回收率。
- 2) 如需提高 RNA 产量, 可用新的 30 ~ 50 μ l RNase-Free H₂O 滴加至膜中重复步骤 8。
- 3) 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。

常见问题与解决方案

常见问题	原因	解决方案
Pure Columns 堵塞	1.样本投入量过多	减少样本起始投入量。
	2.样本研磨不充分	尽可能研磨充分,必要时可加大裂解液的体积及延长离心时间,取上清时,切勿吸到沉淀。
RNA 降解	1.样本保存不当	采用新鲜样本或经过液氮速冻后保存于 $-85 \sim -65^{\circ}\text{C}$ 的样本。冻存样本应尽量避免反复冻融。
	2.设备及环境污染	电泳前将电泳槽用 3% 双氧水浸泡 20 min, 然后用 RNase-free ddH ₂ O 进行冲洗及电泳缓冲液的配制确保 RNase-free 的提取环境。确保提取过程中使用的枪头和离心管均为 RNase-free。
RNA 产量低	1.样本量过少	适当增加投入量, 组织请勿超过 30 mg, 细胞请勿超过 1×10^7 个。
	2.样本保存不当	RNA 降解, 采用新鲜或 $-85 \sim -65^{\circ}\text{C}$ 未冻融的样本。
	3.研磨或匀浆不充分	加大裂解液体积及裂解时间。
	4.洗脱不当	RNase-free ddH ₂ O 加至膜中央, 适当减少洗脱体积, 可 56°C 预热、延长室温放置时间或者进行二次洗脱。
抑制下游或纯度低	1.盐离子残留	Wash Buffer RB 洗脱两次, 加液时沿吸附柱管壁四周加入盖盖后颠倒混匀 2 ~ 3 次, 完全冲洗沾附于管壁上的盐离子。
	2.乙醇残留	延长步骤 8 晾干放置时间, 至乙醇完全挥发。
gDNA 污染	1.样本量过高	不同样本 DNA/RNA 含量相差大, 请勿超过 30 mg 组织和 1×10^7 细胞; 肝、脾和肾 DNA 含量丰富, 请勿超过 10 ~ 20 mg。若需进一步去除 gDNA 残留, 可用 DNase I 进行消化。

本产品仅供研究使用, 请勿用于临床诊断。