

FastPure Cytoplasmic & Nuclear RNA Purification Kit Handbook FastPure 细胞质和细胞核 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

FastPure Cytoplasmic & Nuclear RNA purification Kit		
产品编号	EK-1315-50T	EK-1315-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer RN	12ml	24ml
Buffer RT	32ml	64ml
Buffer RW1	64ml	128ml
Buffer RPE	24ml	48ml
RNase-Free Water	10ml	20ml
RNase-Free 吸附柱	100 个	200 个
2ml Collection Tubes	100 个	200 个
使用手册	1	1

产品介绍

本试剂盒可以快速地从小鼠细胞或组织中提取细胞质或细胞核 RNA，不含酚氯仿等有毒试剂。其提取的总 RNA 纯度高，无蛋白质及其它杂质污染，可用于 RT-PCR、Real Time RT-PCR、mRNA 差异显示、分子克隆等多种下游实验。本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品级化妆品等用途。

存储条件

Buffer RN 收到后置于 2-8°C 保存；Buffer RT 可室温（15°C-25°C）干燥放置至少一年；其他试剂室温干燥保存可至少稳定 12 个月。

需要额外准备的材料

- 14.3 M β-巯基乙醇(β-ME) (常规购买商业化商品即为 14.3 M)或 2M DTT
- 70%乙醇: RNase-Free 水配制
- 无水乙醇（96%-100%）
- 无酶 1.5ml 离心管
- 无酶吸头
- 干净的手套
- 高速离心机
- 物理研磨设备

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 操作前在 Buffer RN 中加入 β-巯基乙醇（β-ME）至终浓度为 1%（建议现配现用），如 1 ml Buffer RN 中加入 10μl β-巯基乙醇(或加入 20 μl 的 2 M DTT)，每次使用前取部分配置。
- Buffer RT 在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请 37°C 加热溶解后室温使用。
- Buffer RW1 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 0.25 倍体积的乙醇（96-100%）以获得工作溶液。
- Buffer RPE 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 4 倍体积的乙醇（96-100%）以获得工作溶液。
- RNase-Free 水中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染，使用时尽量注意，推荐开瓶后分装保存以减少污染风险保证实验稳定性。
- RNA 在 Buffer RT 中不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的离心管或玻璃器皿。
- RNA 提取操作及离心过程室温进行即可。

操作步骤:

1. 请根据样品种类进行以下步骤 (1a 为动物细胞, 1b 为动物组织)

1a. 收集动物细胞: 悬浮细胞可直接 300×g 离心 5min 并仔细吸除上清留沉淀待使用; 单层贴壁细胞可通过直接裂解法(吸尽培养基留下贴壁细胞, 待步骤 2 用 Buffer RN 裂解)或胰酶处理法(吸尽培养基留下贴壁细胞, 用 PBS 清洗细胞, 吸除 PBS 后使用含 0.10%-0.25%胰酶使细胞脱落, 加入含有血清的培养基使胰酶失活后转入无酶 1.5ml 离心管中 300×g 离心 5min, 吸除上清留沉淀待使用)

注意: 收集细胞数量不要超过 1×10^7 , 收集细胞时一定要将细胞培养基去除干净, 可使用 PBS 清洗 1-2 次, 否则会导致步骤 2 时细胞裂解不完全, 影响 RNA 与吸附柱的结合, RNA 的产量降低。

1b. 动物组织匀浆处理: 将 5mg-15mg 动物组织转移入无酶 1.5ml 离心管中并加入 200μl Buffer RN (动物组织量不要超过 15mg) 使用前请检查 Buffer RN 是否加入 β-巯基乙醇, 使用研磨杵或电动研磨机将动物组织彻底研磨匀浆。使用移液器将裂解物转移到无酶离心管中。在台式离心机中以最大速度离心裂解物 10min, 离心后将上清(即细胞质 RNA)转移至新的无酶管中, 沉淀用于核 RNA 提取。进行步骤 4。

2. 加入 4°C 预冷的 180μl Buffer RN(使用前请检查 Buffer RN 是否加入 β-巯基乙醇或 DTT)至细胞沉淀中, 并于冰上孵育 5min。对于未消化收集的培养在 3.5cm 培养皿中的细胞, 可吸净培养基用 PBS 清洗一次后, 直接加入 4°C 预冷的 180μl Buffer RN 至细胞培养皿中, 然后用细胞刮刀轻轻刮动并转移至无酶 1.5ml 离心管中, 并于冰上孵育 5min。

对于提前离心沉淀在离心管中的细胞, 通过轻弹离心管以使细胞沉淀彻底分散开。悬浮液应迅速澄清, 表明质膜立即溶解。注意: 细胞沉淀的不完全分散可能导致裂解效率低下和 RNA 产量降低。

3. 将上述裂解物在 4°C 下以 300×g 离心 2min。将上清液转移到新的无酶 1.5ml 离心管中用于细胞质 RNA 提取, 沉淀用于细胞核 RNA 提取。如果在此过程的后续步骤中使用相同的离心机, 则保持离心室温状态。

上清液含有细胞质提取物。根据细胞类型的不同, 它通常略带混浊和黄色。沉淀含有细胞核, 上清中为细胞质裂解物。

4. 于步骤 3 中所得细胞质裂解物及细胞沉淀管中分别加入 600 μl Buffer RT, 充分涡旋混匀。

若沉淀物较多, 可室温裂解 3-5min, 期间摇匀 2-3 次。

5. 将 430μl 无水乙醇 (96-100%) 分别加入两管裂解物中, 并用移液器将其充分混合。不要离心。

注意: 从某些细胞系纯化 RNA 时, 加入乙醇后可能会出现沉淀。这不会影响后续提取过程。

6. 将步骤 5 混匀后的两管溶液转移入无酶吸附柱中并套上 2ml 收集管, ≥8000×g (≥10,000rpm) 离心 1min, 弃废液, 直至将溶液全部转移完成吸附。

吸附柱最大上柱量为 700μl, 若溶液过多可分多次上柱。后续操作若无特殊说明吸附柱均置于 2ml 收集管中。

7. 向两个吸附柱中分别加入 700μl Buffer RW1, ≥8000×g(≥10,000 rpm) 离心 30s, 弃废液。

8. 将两个吸附柱重收套回收集管中, 向吸附柱中加入 500μl Buffer RPE (使用前请确认 Buffer RPE 按要求加入 4 倍体积无水乙醇), ≥8000×g(≥10,000 rpm) 离心 30s, 弃废液。

9. 重复步骤 8 一次。

10. 倒弃滤液, 将吸附柱放入收集管中, 以最大转速(~13,400×g)离心 3min 干燥柱子。

11. 将两个吸附柱分别套入新的 RNase-Free 的 1.5ml 离心管中, 并置于无 RNA 酶的环境中开盖静置 5-10min 至乙醇晾干。

若吸附柱中残留乙醇将会对纯化后的 RNA 的下游实验造成影响。

12. 向两个吸附柱膜正中央分别加入 30-50μl RNase-Free Water, 盖上盖子室温静置 3-5 min。后置于离心机中 ≥12,000×g(≥13,000 rpm) 离心 3min 得到 RNA 溶液。