

R6831 MicroElute® Total RNA Kit

中文简易说明

√实验前请按说明书正确配制 RNA Wash Buffer II

➤ 使用【无水乙醇】对 RNA Wash Buffer II 进行稀释，稀释后室温保存。

货号	加入量
R6831-00	20mL
R6831-01	48mL
R6831-02	200mL

- 每 1mL TRK Lysis Buffer 需加入 20μl β-巯基乙醇，混匀后大概能在室温下保存 4 星期；
- 可根据下表，选择使用【Nuclease-free Water】将 Carrier RNA 溶解，溶解后保存在-70°C。

货号			加入量	终浓度
R6831-00	步骤 1	Carrier RNA	100μl Nuclease-free Water	1μg/μl
R6831-01			310μl Nuclease-free Water	
R6831-02			1mL Nuclease-free Water	
	步骤 2	5μl Carrier RNA (1μg/μl)	45μl TRK Lysis Buffer	100ng/μl
	步骤 3	5μl Carrier RNA (1μg/μl)	95μl TRK Lysis Buffer	5ng/μl

操作步骤：

A. 从激光解剖样品中提取总 RNA

- 将 300μl TRK Lysis Buffer 的 1.5mL 或 2mL 离心管中；
Note: 每 1mL TRK Lysis Buffer 中需加入 20μl β-巯基乙醇。
另：如样品量 < 5,000 个细胞，建议匀浆前加入 4μl (20ng) Carrier RNA。
- 将匀浆好的样品加入到含有 TRK Lysis Buffer 的离心管中；
- 补充 TRK Lysis Buffer 将体积调整至 350μl，涡旋混匀 30s；
- 向离心管中加入等体积 70%乙醇，涡旋混匀，无需离心；
- 将 HiBind® RNA 结合柱套入到 2mL 收集管中，把混合液转移到柱子中（柱子最大容量是 750μl），在室温下 10,000xg 离心 30s，弃滤液；
- 将 HiBind® RNA 结合柱套入新的 2mL 收集管中，加入 400μl RWF Wash Buffer，按上述条件离心，弃滤液；

Note: 如果需要进行 DNase 消化步骤, 则在此步按照英文说明书第 14 页进行。

7. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入新的 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RNA Wash Buffer II, 按上述条件离心, 弃滤液;

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按说明书用无水乙醇稀释。

8. 重复步骤 7;

9. 将 HiBind[®] RNA 结合柱重新套回 2mL 收集管中, 以最大速度 ($\geq 13,000xg$) 空甩柱子 2min;

10. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 15-20 μ l Nuclease-free Water;

11. 最大速度离心 1min;

12. 将洗脱下来的 RNA 保存至 -70 $^{\circ}$ C 中。

B. 从微解剖福尔马林固定组织中提取 RNA

1. 将 100 μ l TRK Lysis Buffer 的 1.5mL 或 2mL 离心管中;

Note: 每 1mL TRK Lysis Buffer 中需加入 20 μ l β -巯基乙醇。

另: 如样品量 < 5,000 个细胞, 建议匀浆前加入 4 μ l (20ng) Carrier RNA。

2. 将匀浆后的样品加入到含有 TRK Lysis Buffer 的离心管中;

3. 补充 TRK Lysis Buffer 将体积调整至 150 μ l, 涡旋混匀 30s;

4. 加入 295 μ l Nuclease-free water, 加入 5 μ l Proteinase K (20mg/mL), 涡旋混匀;

5. 55 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 室温下最大速度离心 5min, 可能会形成组织碎片, 可看见一层薄膜, 漂浮在上层;

6. 将上清液 (约 450 μ l) 转移到新的离心管中, 加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 涡旋混匀;

Note: 注意不要转移到任何不溶物, 包括可能形成的上层薄膜。吸取上清时可用枪头拨离开再吸取上清液。

7. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入到 2mL 收集管中, 把混合液转移到柱子中 (柱子最大容量是 750 μ l), 在室温下 10,000 xg 离心 30s, 弃滤液;

Note: 如果需要进行 DNase 消化步骤, 则在此步按照英文说明书第 14 页进行。

8. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入新的 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RWF Wash Buffer, 在室温下 10,000 xg 离心 30s, 弃滤液;

9. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入新的 2mL 收集管中, 加入 500 μ l RNA Wash Buffer II, 在室温下 10,000 xg 离心 30s, 弃滤液;

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按说明书用无水乙醇稀释。

10. 重复步骤 9;

11. 将 HiBind[®] RNA 结合柱重新套回 2mL 收集管中, 以最大速度 ($\geq 13,000xg$) 空

甩柱子 2min;

12. 将 HiBind® RNA 结合柱套入到新的 1.5mL 离心管中,加入 15-20µl Nuclease-free Water 到 RNA 结合柱膜中央;

13. 最大速度离心 1min 洗脱 RNA。

14. 将洗脱的 RNA 保存至-70°C中。

C. 从动物组织或细胞培养物中提取 RNA

1. 将细胞 (< 5×10⁵) 或组织 (< 5mg) 样品进行匀浆;

Note: 如样品量 < 5,000 个细胞, 建议匀浆前加入 4µl (20ng) Carrier RNA。

2. 加入到含有 350µl TRK Lysis Buffer 的 1.5mL 或 2mL 的离心管中。

Note: 每 1mL TRK Lysis Buffer 中需加入 20µl β-巯基乙醇。

3. 将匀浆后的样品加入到含有 TRK Lysis Buffer 的离心管中, 涡旋混匀 30s;

4. 室温下 13,000xg 离心 2min;

5. 将上清液转移到新的 1.5mL 离心管中, 加入等体积 70%的乙醇, 涡旋混匀;

6. 将 HiBind® RNA 结合柱套入到 2mL 收集管中, 把步骤 5 中的混合液转移到柱子中 (柱子最大容量量是 750µl), 在室温下 10,000xg 离心 30s, 弃滤液;

Note: 如果需要进行 DNase 消化步骤, 则在此步按照后文中的“DNase I 消化步骤”进行按照英文说明书第 14 页进行。

7. 将 HiBind® RNA 结合柱套入新的 2mL 收集管中, 加入 500µl RWF Wash Buffer, 在室温下 10,000xg 离心 30s, 弃滤液;

8. 将 HiBind® RNA 结合柱套入新的 2mL 收集管中, 加入 500µl RNA Wash Buffer II, 在室温下 10,000xg 离心 30s, 弃滤液;

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按说明书用无水乙醇稀释。

9. 重复步骤 8;

10. 将 HiBind® RNA 结合柱重新套回 2mL 收集管中, 以最大速度 (≥13,000xg) 空甩柱子 2min;

11. 将 HiBind® RNA 结合柱套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 15-20µl Nuclease-free Water 到 RNA 结合柱膜中央;

12. 最大速度离心 1min 洗脱 RNA;

13. 将洗脱的 RNA 保存至-70°C中。

D. 从纤维组织中提取 RNA

1. 将 < 5mg 样品加入到 1.5mL 的微量离心管中进行匀浆；
2. 加入 150 μ l TRK Lysis Buffer，按照英文说明书第 4 页进行匀浆。每 1mL TRK Lysis Buffer 中需加入 20 μ l β -巯基乙醇。

Note: 如果样品不能匀浆化，将可能堵塞柱子导致产量降低，通过使用研钵和研杵或针筒和注射器进行破碎和均质化提取的产量也较低。对于动物组织，推荐使用转子定子均化器或珠磨方法。

3. 每个样品中加入 290 μ l Nuclease-free Water，加入 5 μ l Proteinase K (20mg/mL)，涡旋混匀；
4. 55 $^{\circ}$ C 孵育 10min，室温下 13,000xg 离心 5min，可能会形成组织碎片，可看见一层薄膜，漂浮在上层；
5. 将上清液转移到新的 2mL 离心管中，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，涡旋混匀；

Note: 注意不要转移到任何不溶物，包括可能形成的上层薄膜。吸取上清时可用枪头拨离开再吸取上清液。

6. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入到 2mL 收集管中，把步骤 5 中的混合液转移到柱子中（柱子最大容量量是 750 μ l），在室温下 10,000xg 离心 30s，弃滤液；

Note: 如果需要进行 DNase 消化步骤，按照下文中 DNase 的消化步骤进行。

7. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入新的 2mL 收集管中，加入 500 μ l RWF Wash Buffer，在室温下 10,000xg 离心 30s，弃滤液；
8. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入新的 2mL 收集管中，加入 500 μ l RNA Wash Buffer II，在室温下 10,000xg 离心 30s，弃滤液；

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按说明书用无水乙醇稀释

9. 重复步骤 8；
10. 将 HiBind[®] RNA 结合柱重新套回 2mL 收集管中，以最大速度 ($\geq 13,000xg$) 空甩柱子 2min；
11. 将 HiBind[®] RNA 结合柱套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 15-20 μ l Nuclease-free Water 到 RNA 结合柱膜中央；
12. 最大速度离心 1min 洗脱 RNA；
13. 将洗脱的 RNA 保存至 -70 $^{\circ}$ C 中。

DNase I 消化步骤: (货号 E1091)

1. 按照标准方案步骤, 裂解液完全通过 HiBind RNA column, 按照以下操作:
2. 为每个 HiBind RNA column, 按照下表配制 DNase I 混合液:

组分	体积
OBI DNase I Digestion Buffer	73.5 μ l
RNase-free DNase I (20 Kunitz unites/ μ l)	1.5 μ l
总体积	75 μ l

Note:

- a. DNase I 很容易就会发生物理变性, 所以不要用涡旋混匀, 可采用轻柔颠倒混匀, 在加入前配制新鲜的 DNase I 混合液;
 - b. 配备的 OBI DNase I Digestion Buffer 中不含 RNase;
 - c. 标准的 DNase 缓冲液与膜上的 DNase 不会相互消化
3. 将 75 μ l 的 DNase I 混合液加入到柱子膜中;
 4. 室温 (25-30 $^{\circ}$ C) 静置 15min;
 5. 将柱子套入到 2mL 收集管中, 加入 400 μ l RWF Wash Buffer, 室温静置 5min, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液, 将柱子重新套回到收集管中;
 6. 按照标准方案进行洗涤和洗脱步骤。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准