

R6834 Total RNA Kit I

中文简易说明

√实验前请按说明书正确稀释 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
R6834-00	20mL
R6834-01	48mL
R6834-02	200mL

➤ 选做：每 1mL TRK Lysis Buffer 加入 20 μ l β -巯基乙醇，配置后可在室温下保存两个星期。

A. 细胞或组织的实验方案

- 使用前每 1mL TRK Lysis Buffer 加入 20 μ l β -巯基乙醇。
 - < 5 $\times 10^6$ 细胞：350 μ l TRK Lysis Buffer/ β -巯基乙醇混合液；
 - < 1 $\times 10^7$ 细胞：700 μ l TRK Lysis Buffer/ β -巯基乙醇混合液；
- 悬浮培养细胞：500xg 离心 5min 收集细胞，弃去培养液，加入 TRK Lysis Buffer 吹打裂解细胞，将裂解液转移至匀浆柱中，匀浆柱套入 2mL 离心管中，常温 14000xg 离心 2min 去除不溶解的杂质，收集滤液；
- 贴壁培养细胞：弃去培养基，加入 TRK Lysis Buffer 至培养瓶中，吹打裂解细胞；将裂解液转移至匀浆柱中，匀浆柱套入 2mL 离心管中，常温 14000xg 离心 2min 去除不溶解的杂质，收集滤液；
 - < 15mg 组织：350 μ l TRK Lysis Buffer/ β -巯基乙醇混合液；
 - 20-30mg 组织：700 μ l TRK Lysis Buffer/ β -巯基乙醇混合液；
- 动物软组织样品：称取 15mg-30mg 样品，使用液氮研磨后加入 TRK Lysis Buffer 或者加入 TRK Lysis Buffer 用匀浆器匀浆，将裂解液转移至匀浆柱中，匀浆柱套入 2mL 离心管中，常温 14,000xg 离心 2min 去除不溶解的杂质，收集滤液。
- 加入等倍体积的 70%乙醇到滤液中，涡旋混匀；
- 将 RNA 结合柱套入收集管中，转移第二步得到的混合液（每次转移的混合液 \leq 700 μ l），室温 10000xg 离心 1min，弃滤液；
- 重复步骤 3，直至所有混合液都结合到 RNA 结合柱上；
- 将 RNA 结合柱套入收集管中，加入 500 μ l RNA Wash Buffer I 至结合柱中，10000xg 离心 30s，弃滤液；
- 将 RNA 结合柱套回收集管中，加入 500 μ l RNA Wash Buffer II 至结合柱中，10000xg 离心 1min，弃滤液；

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

7. 重复步骤 6;
8. 将 RNA 结合柱套回收集管中, 10000xg 离心空甩 2min。
9. 将 RNA 结合柱套入新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-70 μ l Nuclease-free Water 至结合柱中, 10000xg 离心 2min 洗脱 RNA, 产物放置-70 $^{\circ}$ C 保存。

B. 结合 DNase 酶实验方案

1. 使用前每 1mL TRK Lysis Buffer 加入 20 μ l 巯基乙醇。
 - < 5 $\times 10^6$ 细胞: 350 μ l TRK Lysis Buffer/ β -巯基乙醇混合液;
 - < 1 $\times 10^7$ 细胞: 700 μ l TRK Lysis Buffer/ β -巯基乙醇混合液;
- d. 悬浮培养细胞: 500xg 离心 5min 收集细胞, 弃去培养液, 加入 TRK Lysis Buffer 吹打裂解细胞, 将裂解液转移至匀浆柱中, 匀浆柱套入收集管中, 常温 14000xg 离心 2min 去除不溶解的杂质, 收集滤液;
- e. 贴壁培养细胞: 弃去培养基, 加入 TRK Lysis Buffer 至培养瓶中, 吹打裂解细胞; 将裂解液转移至匀浆柱中, 匀浆柱套入收集管中, 常温 14000xg 离心 2min 去除不溶解的杂质, 收集滤液;
 - < 15mg 组织: 350 μ l TRK Lysis Buffer/ β -巯基乙醇混合液;
 - 20-30mg 组织: 700 μ l TRK Lysis Buffer/ β -巯基乙醇混合液;
- f. 动物软组织样品: 称取 15mg-30mg 样品, 使用液氮研磨后加入 TRK Lysis Buffer 或者加入 TRK Lysis Buffer 用匀浆器匀浆, 将裂解液转移至匀浆柱中, 匀浆柱套入收集管中, 常温 14000xg 离心 2min 去除不溶解的杂质, 收集滤液。
2. 加入等体积的 70%乙醇到滤液中, 涡旋混匀。
3. 将 RNA 结合柱套入收集管中, 转移第二步得到的混合液 (每次转移的混合液 \leq 700 μ l), 室温 10000xg 离心 1min, 弃滤液。
4. 重复步骤 3, 直至所有混合液都结合到 RNA 结合柱上。
5. 将 RNA 结合柱套入收集管中, 加入 250 μ l RNA Wash Buffer I 至结合柱中, 10000xg 离心 30 秒, 弃滤液。
6. DNase I 消化
 - A. 按下表配置 DNase I 溶液, 混匀。

溶液名称	每份配量
Digestion Buffer	73.5 μ l
RNase-Free DNase I	1.5 μ l
总量	75 μ l

- B. 将配置好的 75 μ l 的 DNase I 溶液, 转移至结合柱膜的正中央。

C. 室温静置 15min。

7. 加入 250 μ l RNA Wash Buffer I 至结合柱中, 室温静置 2min, 10000xg 离心 1min, 弃滤液。
8. 将 RNA 结合柱套回收集管中, 加入 500 μ l RNA Wash Buffer II 至结合柱中, 10000xg 离心 1min, 弃滤液。

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

9. 重复步骤 8;
10. 将 RNA 结合柱套回收集管中, 10000xg 离心空甩 2min;
11. 将 RNA 结合柱套入新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-70 μ l Nuclease-free Water 至结合柱中, 10000xg 离心 2min 洗脱 RNA, 产物放置-70 $^{\circ}$ C 保存。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准