

R6934 Total RNA Kit II

简易中文步骤

√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
R6934-00	20mL
R6934-01	48mL
R6934-02	200mL

➤ 每 1mL RNA-Solv[®] Reagent 加入 20μl β-巯基乙醇。

提取步骤：

A. 细胞或组织的实验方案

1. 使用前每 1mL RNA Solv[®] Reagent 加入 20μl β-巯基乙醇。
 $< 5 \times 10^6$ 细胞：500μl RNA Solv[®] Reagent/β-巯基乙醇混合液；
 $< 1 \times 10^7$ 细胞：1000μl RNA Solv[®] Reagent/β-巯基乙醇混合液；
 - a. 悬浮培养细胞：500xg 离心 5min 收集细胞，弃去培养液，加入 RNA Solv[®] Reagent 吹打裂解细胞，转移至 1.5mL/2mL 离心管中，室温静置 5min；
 - b. 贴壁培养细胞：弃去培养基，加入 RNA Solv[®] Reagent 至培养瓶中，吹打裂解细胞，转移至 1.5mL/2mL 离心管中，室温静置 5min；
 - c. 动物组织样品：称取 < 30 mg 样品，使用液氮研磨后，转移至 1.5mL/2mL 离心管中，加入 1mL RNA Solv[®] Reagent，涡旋混匀，室温静置 5min。
2. 加入 100μl ($< 5 \times 10^6$ 细胞) 或 200μl ($> 5 \times 10^6$ 细胞) 氯仿，高速震荡 20s，室温下静置 2-3min；
3. 在 4°C 下，12,000xg 离心 15min；
4. 转移上清 (约 80%) 至一新的离心管中，加入等体积的 70%乙醇到上清液中，涡旋混匀。
5. 将 RNA 结合柱套入收集管中，转移第 4 步得到的混合液 (每次转移的混合液 $\leq 700\mu$ l)，室温 10000xg 离心 1min，弃滤液。
6. 重复步骤 5，直至所有混合液都结合到 RNA 结合柱上。
7. 将 RNA 结合柱套入到 2mL 收集管中，加入 500μl RNA Wash Buffer I 至结合柱中，10000xg 离心 30s，弃滤液；
8. 将 RNA 结合柱套回收集管中，加入 500μl RNA Wash Buffer II 至结合柱中，10000xg 离心 1min，弃滤液；
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 45-75 μ l DEPC 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 RNA Solv[®] Reagent 加入 20 μ l β -巯基乙醇。
 - < 5 $\times 10^6$ 细胞: 500 μ l RNA Solv[®] Reagent/ β -巯基乙醇混合液;
 - < 1 $\times 10^7$ 细胞: 1000 μ l RNA Solv[®] Reagent / β -巯基乙醇混合液;
 - a. 悬浮培养细胞: 500xg 离心 5min 收集细胞, 弃去培养液, 加入 RNA Solv[®] Reagent 吹打裂解细胞, 转移至 1.5mL/2mL 离心管中, 室温静置 5min;
 - b. 贴壁培养细胞: 弃去培养基, 加入 RNA Solv[®] Reagent 至培养瓶中, 吹打裂解细胞, 转移至 1.5mL/2mL 离心管中, 室温静置 5min;
 - < 30mg 组织: 1000 μ l RNA Solv[®] Reagent / β -巯基乙醇混合液
 - c. 动物组织样品: 称取 < 30mg 样品, 使用液氮研磨后, 转移至 1.5mL/2mL 离心管中, 加入 RNA Solv[®] Reagent, 涡旋混匀, 室温静置 5min。
2. 加入 200 μ l 氯仿, 高速震荡 20s, 室温静置 2-3min, 在 4 $^{\circ}$ C, 12,000xg 离心 15min;
3. 转移上清 (约 80%) 至一新的离心管中, 加入等体积的 70%乙醇到上清液中, 涡旋混匀;
4. 将 RNA 结合柱套入收集管中, 转移第 3 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;
5. 重复步骤 4, 直至所有混合液都结合到 RNA 结合柱上;
6. 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 30s, 弃滤液。
7. 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。
8. 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。

9. 将 RNA 结合柱套回收集管中, 加入 500 μ l RNA Wash Buffer II (已加无水乙醇稀释) 至结合柱中, 10000xg 离心 1min, 弃滤液。
10. 重复步骤 9;
11. 将 RNA 结合柱套回收集管中, 10000xg 离心空甩 2min。
12. 将 RNA 结合柱套入新的 1.5mL 离心管中, 加入 45-75 μ l DEPC Water 至结合柱中, 室温静置 1min, 10,000xg 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