

ATGPure[®] Cell/Tissue RNA Extraction Kit (Column)

细胞/组织 RNA 抽提试剂盒 (柱式)

R303

Version 23.1.1



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

产品简介	1
产品组成	1
储存条件	1
准备事项	2
实验步骤	3
常见问题与解决方案	4

产品简介

本试剂盒可从动物细胞或组织中快速提取总 RNA。本产品采用了一种新型的吸附材料，新吸附柱具有良好的流速、超强的 RNA 结合能力和优秀的洗脱效率，操作过程快速、方便，无需使用有毒的酚/氯仿抽提，同时配以优化后的 Buffer 溶液，使得到的总 RNA 纯度高，无蛋白和其他杂质污染，产物可用于 RT-PCR、Real-Time PCR、芯片分析等多种下游实验。

产品组成

组分	R303 (50 rxns)	R303 (250 rxns)
纯化套件 (吸附柱+收集管)	50 套	250 套
Buffer AVL	31 ml	155 ml
Buffer W1	19 ml	95 ml
Buffer W2	13 ml	65 ml
Buffer AVE	3 ml	15 ml
Carrier RNA	310 µg	1350 µg
Proteinase K	24 mg	120 mg

储存条件

- ❖ 试剂盒常温运输，未开启的试剂盒可以于室温 (15-25℃) 保存，有效期见包装。
- ❖ Carrier RNA 干粉可在室温下保存一年，但溶解的 Carrier RNA 溶液，将其分成大小合适的小份，须保存于-30℃至-15℃的温度下，有效期一年。
- ❖ Proteinase K 干粉可在室温下保存一年，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20℃至 8℃。
- ❖ 其他组分可于室温存放一年，长期存放请置于 2-8℃。
- ❖ Buffer AVL 中含有刺激性的化合物，操作过程中应穿上实验服，戴好乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，防止吸入口鼻。沾染皮肤或眼睛后，请立即用清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医生的帮助。

准备事项

自备材料:

小型高速离心机 (最大离心力 $\geq 20,000$ rpm)

匀浆器 (组织样品)

点动涡旋仪

1.5 ml 离心管

无水乙醇 (96 ~ 100%)

Buffer PBS (可选)

试剂准备:

1. Buffer W1 使用前必须用无水乙醇稀释, 无水乙醇添加量参见瓶身标签, 并于室温保存。
2. Buffer W2 使用前必须用无水乙醇稀释, 无水乙醇添加量参见瓶身标签, 并于室温保存。
3. Proteinase K 溶液 (20 mg/ml): 加入适量的 Buffer AVE 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20 mg/ml, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。
 - ❖ Proteinase K 干粉可在室温下保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于 -20°C 至 8°C 。
4. Carrier RNA 溶液 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$): 加入适量的 Buffer AVE 溶解 Carrier RNA 至终浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, (即: 向 310 μg Carrier RNA 添加 310 μl Buffer AVE, 或向 1350 μg Carrier RNA 中添加 1350 μl Buffer AVE; 检查试管标签上的含量)。彻底溶解 Carrier RNA, 将其分成大小合适的小份, 并将其储存在 -30°C 至 -15°C 的温度下。
 - ❖ 勿将 Carrier RNA 的等分试样反复冻融超过 3 次。
5. 向 Buffer AVL 中添加已溶解的 Carrier RNA: 每 560 μl Buffer AVL 中加入 10 μl Carrier RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 将试管倒置 10 次, 轻轻搅拌。为避免起泡, 请勿涡流。
 - ❖ Buffer AVL-Carrier RNA 应新鲜制备, 并在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下稳定长达 48 h。该溶液在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下储存时会产生沉淀, 使用前必须在 80°C 下加热重新溶解。不要在 80°C 下孵育超过 5 min。AVL-Carrier RNA 溶液的加热重溶不得超过 6 次, 频繁升温 and 长时间孵育会导致 Carrier RNA 降解, 导致 RNA 回收率降低, 最终导致 RT-PCR 结果假阴性。

实验步骤：

本方案用于使用离心法从 140 μ l 血浆、血清、尿液、细胞培养基或无细胞体液中纯化 RNA。

1. **转移 570 μ l 含有 Carrier RNA 的 Buffer AVL 至 1.5 ml 的离心管中。**
2. **转移 20 μ l Proteinase K 至 1.5 ml 离心管中。(可选)**
3. **转移 140 μ l 液体样品** (如血清、血浆、细胞培养液、组织匀浆液上清等) 至装有 Buffer AVL-Carrier RNA 的离心管中，涡旋混匀 15 sec。

培养细胞：悬浮培养的细胞或经消化脱落的贴壁细胞离心收集。细胞数量 $<2 \times 10^6$ /ml 留下细胞团块和少量上清，震荡混匀至无团块；细胞数量 $>2 \times 10^6$ /ml，离心后仅留下团块，充分振荡松散细胞，加入配好的 Buffer AVL-Carrier RNA 140 μ l，立即提取。

咽拭子、口腔拭子或肛拭子：取拭子样品放置于 1.5 ml 离心管，加入适量的 0.3-0.6 ml Buffer PBS，充分涡旋混匀后，取 100-250 μ l 重悬液进行操作。

动植物组织等固体样品：取 50-100 mg 样品，加入 1 ml Buffer PBS，用匀浆器匀浆打散样品后，13,000 rpm 离心 3 min，取 100-250 μ l 上清进行操作。

哺乳动物抗凝血：动物血液含有大量的蛋白质和核酸，建议样品用量为 100-200 μ l，过量的样品可能会引起吸附柱的堵塞。禽类血液核酸含量非常高，只能使用血清或血浆样品。

❖ 如果样品体积大于 140 μ l，则按比例增加 Buffer AVL-Carrier RNA 的量 (例如，280 μ l 样品需要 1140 μ l Buffer AVL-Carrier RNA)。

4. **室温孵育 10 min。**
 - ❖ 病毒颗粒在室温下裂解 10 min 后即完成裂解。较长的孵育时间对纯化 RNA 的产量和质量没有影响。
5. **转移 560 μ l 无水乙醇至含有以上混合液的 1.5 ml 离心管中，涡旋混匀 15 sec，短暂离心 (将 1.5 ml 离心管盖子内的液滴甩到管内)。**
6. 把吸附柱装在 2 ml 收集管中，**转移 630 μ l 混合液至吸附柱中。**室温静置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min。
7. 弃滤液把吸附柱装回收集管中，**转移剩余混合液至吸附柱中。**重复步骤 6：室温静置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min。
8. 弃滤液把吸附柱装回收集管中，**加入 500 μ l Buffer W1 (用乙醇稀释) 至吸附柱中，**12,000 rpm 离心 1 min。

9. 弃滤液把吸附柱装回收集管中，加入 500 μ l Buffer W2 (用乙醇稀释) 至吸附柱中，12,000 ~ 14,000 rpm 离心 3 min。
10. 弃滤液把吸附柱装回收集管，12,000 ~ 14,000 rpm 离心 2 min，以甩干吸附柱。
 - ❖ 为避免反流污染, 可将步骤 6 至 8 的旧收集管与滤液一起丢弃, 每次将吸附柱装入新的收集管中。
11. 将吸附柱转移至新的 1.5 ml 离心管。加入 30-50 μ l Buffer AVE 至吸附柱的膜中央。室温静置 2 min。12,000 rpm 离心 1 min。
 - ❖ 体积小于 30 μ l 的洗脱将导致产量降低, 并且不会增加洗脱液中 RNA 的最终浓度。
12. 弃去吸附柱, RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。
 - ❖ RNA 在-90 $^{\circ}$ C至-65 $^{\circ}$ C下储存可稳定长达 1 年。

常见问题与解决方案

1. 实验操作问题

试剂准备有误: 按瓶子标签所示, 加入合适体积的无水乙醇至 Buffer W1 和 Buffer W2 中。

样品多次冻融: 应避免反复冻融。始终使用新鲜样品或仅解冻一次的样品。

Buffer AVL 准备不正确: 检查 Buffer AVL 是否有沉淀物。在 80 $^{\circ}$ C 下孵育溶解沉淀物。

样本中病毒浓度低: 使用微浓缩仪将样品体积浓缩至 140 μ l。

2. 下游应用结果不理想

Carrier RNA 降解: 用 Buffer AVE 溶解的 Carrier RNA 未在-30 $^{\circ}$ C至-15 $^{\circ}$ C下储存或经历多次冻融循环。或者, 在 2-8 $^{\circ}$ C下将 Buffer AVL-Carrier RNA 混合物储存 48 h 以上。

Proteinase K 活性下降: 重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于-20 $^{\circ}$ C。分装保存 Proteinase K, 避免反复冻融。

Buffer AVE 被污染: 更换新的 Buffer AVE 或者使用 DEPC 水。

乙醇残留: 吸附柱在洗脱前, 需要空甩去除乙醇。对于敏感的应用, 吸附柱在洗脱后, 打开吸附柱的盖子, 放置 10-15 min 让乙醇彻底挥发。

盐分残留: 重复用 500 μ l Buffer W2 洗涤吸附柱一次。



025-85653525

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室