

YALEPIC[®] 动物细胞/组织总 RNA 快速提取试剂盒

YALEPIC[®] Animal Cell & Tissue Total RNA Fast Isolation Kit

产品货号: YR23017 (50T) ; (试) YR23017 (5T)

产品保存及运输条件:

常温运输; 10 ~ 30°C 室温保存。

产品概述

YALEPIC[®] Animal Cell & Tissue Total RNA Fast Isolation Kit 基于异硫氰酸胍裂解与硅基质膜纯化相结合的技术, 适用于从动物组织、细胞中快速提取总 RNA。提取过程中无需使用氯仿, 采用硅基质膜吸附 RNA, 搭配优化后的缓冲液进行纯化, Fast gDNA Filter Columns 能有效地去除杂质和 gDNA, Pure Columns RT 能高效地结合 RNA。提取的总 RNA 纯度高, 如敏感实验需完全去除残留 DNA, 可用 RNase-free 的 DNase I 进行消化去除。提取的 RNA 可用于 RT-PCR、荧光定量 PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、Ploy (A) 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

产品组分

序号	产品组分	YR23017	(试) YR23017
①	YLC Buffer	37 ml	4 ml
②	Wash Buffer RA	42 ml	4.5 ml
③	Wash Buffer RB	12 ml	6 ml
④	RNase-free ddH ₂ O	11 ml	1 ml
⑤	Proteinase K	550 µl	60 µl
⑥	Fast gDNA Filter Columns with Collection Tubes	50 T	5 T
⑦	Pure Columns RT with Collection Tubes	50 T	5 T
⑧	Nuclease-free Centrifuge Tubes (1.5 ml) 赠	50 T	5 T

适用范围

动物组织: 10 ~ 30 mg

培养细胞: $\leq 1 \times 10^7$ 个



自备试剂及仪器

无水乙醇（提取 RNA 专用）；70% 乙醇（RNase-free ddH₂O 配制）；Nuclease-free 离心管；Nuclease-free 移液器吸头；高速离心机；恒温水浴锅；涡旋振荡仪等。

实验准备及注意事项

1. 使用本试剂盒前做好防护措施，穿戴实验服、手套、口罩等，与常规 RNA 实验操作环境一致。
2. 使用 Nuclease-free 的移液器吸头和消耗品，配制溶液应使用 RNase-free ddH₂O，试剂使用后立即盖好瓶盖，避免交叉污染的风险。
3. 使用前请检查 **YLC Buffer** 中是否有晶体析出，如有晶体析出，可放置 56°C 水浴锅使晶体溶解，混匀后放置室温使用。
4. 首次使用前，向 **Wash Buffer RB** 中加入瓶标签指定体积的无水乙醇。试用装（5T）中 **Wash Buffer RB** 已含无水乙醇，使用后请立即盖好瓶盖防止乙醇挥发。
5. 使用新鲜样本，若不能及时提取，将样本立即置于液氮中，速冻后于 -85 ~ -65°C 保存，并避免反复冻融。
6. 样本破碎需彻底，否则会影响 RNA 的产量；匀浆时尽量控制温度，防止因高温导致的 RNA 降解。
7. 如需单独除去 DNA，建议选用 RNase-free 的 **DNase I** (YALI#YX27002) 进行处理。

实验流程

● 样品处理

1. 动物组织
 - 1) 匀浆处理：取新鲜组织，每 10 ~ 20 mg 加入 350 μ l **YLC Buffer**，用电动匀浆器进行冰上进行匀浆，直至无明显组织块即可，加入 10 μ l **Proteinase K**，涡旋混匀后室温静置 5 min。
 - 2) 液氮研磨：将组织在液氮中磨碎成粉末。每 10 ~ 20 mg 组织加 350 μ l **YLC Buffer**，样品体积不超过总体积的十分之一，涡旋振荡至无明显粉末团即可。加入 10 μ l **Proteinase K**，涡旋混匀后室温静置 5 min。（注：匀浆完或者液氮研磨后的样本，若不立即提取，可置于 -85 ~ -65°C 保存）
2. 培养细胞
 - 1) 贴壁细胞：将细胞在培养瓶中直接裂解或处理成细胞悬液，12,000 rpm 离心 1 min 弃上清，得到细胞沉淀。每 6 ~ 10 cm² 培养面积加入 600 μ l **YLC Buffer**，小于 6 cm² 加入 350 μ l **YLC Buffer**，涡旋振荡使其充分裂解，直至无明显细胞团即可。加入 10 μ l **Proteinase K**，涡旋混匀后室温静置 5 min。
 - 2) 细胞悬液：12,000 rpm 离心 1 min，弃上清，得到细胞沉淀。每 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 细胞加入 600 μ l **YLC Buffer**，少于 5×10^6 细胞加入 350 μ l **YLC Buffer**，涡旋振荡使其充分裂解，直至无明显细胞团即可。加入 10 μ l **Proteinase K**，涡旋混匀后室温静置 5 min。（注：应除尽细胞培养基，使细胞充分悬浮并充分裂解，避免影响 RNA 产量。细胞裂解后的样本，若不立即提取，可置于 -85 ~ -65°C 保存）



● RNA 提取

1. 样品充分裂解后, 12,000 rpm 离心 2 ~ 5 min。
2. 将上清液转移至已装入收集管的吸附柱 (**Fast gDNA Filter Columns with Collection Tubes**) 中, 12,000 rpm 离心 30s, 弃掉 **Fast gDNA Filter Columns**, 收集滤液至一个新的 Nuclease-free 离心管 (自备)。
3. 缓慢加入与滤液等体积 (600 μ l 或 350 μ l) 的 70% 乙醇 (自备, RNase-free ddH₂O 配制), 混匀 (此时可能会出现沉淀)。
4. 将步骤 3 所得溶液和沉淀全部加入到已装入收集管的吸附柱 (**Pure Columns RT with Collection Tubes**) 中, 若一次不能将全部溶液加入吸附柱中, 可分两次转入。12,000 rpm 离心 30 s, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。
5. 向吸附柱中加入 700 μ l **Wash Buffer RA**, 12,000 rpm 离心 30 s, 弃去收集管中废液, 将吸附柱放回收集管中。 (如下游实验对微量 DNA 敏感, 则建议用以下步骤替代步骤 5, 彻底去除微量 DNA)
 - *1) 向吸附柱中加入 350 μ l **Wash Buffer RA**, 12,000 rpm 离心 15 s, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
 - *2) 配制 DNase I ([YALI#YX27002](#)) 混合液: 取 52 μ l RNase-free ddH₂O, 向其中加入 20 μ l DNase I (1 U/ μ l) 及 8 μ l 10 $\times$ DN Buffer, 混匀配制终体积为 80 μ l 的反应液。如应用其他公司产品请参考相应说明书。
 - *3) 向吸附柱中加入 80 μ l 配制好的 DNase I 反应液, 20 ~ 30 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。
 - *4) 向吸附柱中加入 350 μ l **Wash Buffer RA**, 12,000 rpm 离心 15 s, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
6. 向吸附柱中加入 500 μ l **Wash Buffer RB** (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30 s, 弃去收集管中废液, 将吸附柱放回收集管中。重复该步骤一次。
7. 12,000 rpm 离心 2 min, 弃去收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。 (注: 乙醇残留会影响后续的酶促反应, 应将吸附柱中残余的乙醇彻底去除)
8. 将吸附柱置于一个新的 **Nuclease-free Centrifuge Tubes (1.5 ml)** 中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 30 ~ 50 μ l **RNase-free ddH₂O**, 室温放置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集 RNA 溶液, 提取的 RNA 可直接用于下游实验或于 -85 ~ -65 $^{\circ}$ C 保存, 防止降解。

注:

- 1) RNase-free ddH₂O 体积不应小于 30 μ l, 体积过小影响回收率。
- 2) 如需提高 RNA 产量, 可用新的 30 ~ 50 μ l RNase-Free H₂O 滴加至膜中重复步骤 8。
- 3) 如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 8。



常见问题与解决方案

常见问题	原因	解决方案
Pure Columns 堵塞	1.样本投入量过多	减少样本起始投入量。
	2.样本研磨不充分	尽可能研磨充分，必要时可加大裂解液的体积及延长离心时间，取上清时，切勿吸到沉淀。
RNA 降解	1.样本保存不当	采用新鲜样本或经过液氮速冻后保存于 $-85 \sim -65^{\circ}\text{C}$ 的样本。冻存样本应尽量避免反复冻融。
	2.设备及环境污染	电泳前将电泳槽用 3% 双氧水浸泡 20 min，然后用 RNase-free ddH ₂ O 进行冲洗及电泳缓冲液的配制确保 RNase-free 的提取环境。确保提取过程中使用的枪头和离心管均为 RNase-free。
RNA 产量低	1.样本量过少	适当增加投入量，组织请勿超过 30 mg，细胞请勿超过 1×10^7 个。
	2.样本保存不当	RNA 降解，采用新鲜或 $-85 \sim -65^{\circ}\text{C}$ 未冻融的样本。
	3.研磨或匀浆不充分	加大裂解液体积及裂解时间。
	4.洗脱不当	RNase-free ddH ₂ O 加至膜中央，适当减少洗脱体积，可 56°C 预热、延长室温放置时间或者进行二次洗脱。
抑制下游或纯度低	1.盐离子残留	Wash Buffer RB 洗脱两次，加液时沿吸附柱管壁四周加入盖盖后颠倒混匀 2 ~ 3 次，完全冲洗沾附于管壁上的盐离子。
	2.乙醇残留	延长步骤 8 晾干放置时间，至乙醇完全挥发。
gDNA 污染	1.样本量过高	不同样本 DNA/RNA 含量相差大，请勿超过 30 mg 组织和 1×10^7 细胞；肝、脾和肾 DNA 含量丰富，请勿超过 10 ~ 20 mg。若需进一步去除 gDNA 残留，可用 DNase I 进行消化。

本产品仅供研究使用，请勿用于临床诊断