



(DP431) 动物组织总RNA提 取试剂盒操作指南 ——动物组织

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170329

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. 动物组织（50-100 mg）
2. 无水乙醇， β -巯基乙醇
3. 一次性无菌注射器（DNase I 配置），移液器及配套RNase-Free无菌枪头（200 μ l，1ml）；1.5 ml，2.0ml 离心管（RNase-free）
4. 通风橱 研磨器 涡旋振荡器 金属浴 台式低温离心机



实验准备-试剂盒准备1

第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。并在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。



DNase I储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550 μ l RNase-Free ddH₂O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。



注意：从-20 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。

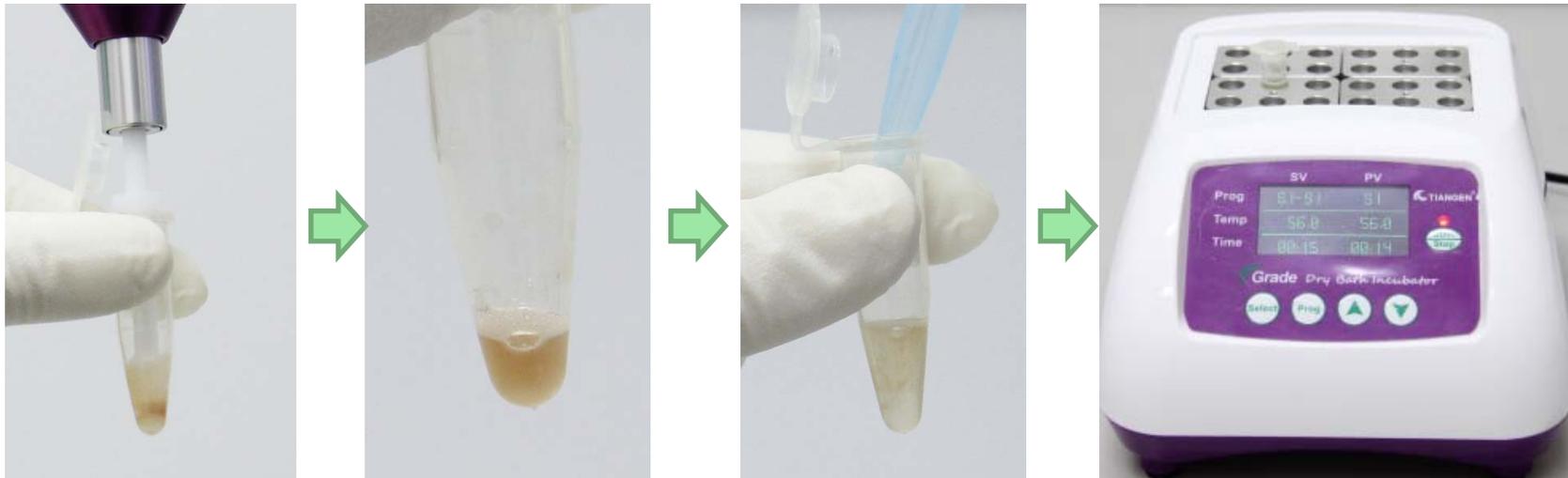
实验准备-试剂盒准备2

此步骤建议在通风橱内操作

操作前在RL中加入 β -巯基乙醇至终浓度为1%，如1 ml RL中加入10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RL 4 $^{\circ}$ C可放置一个月，裂解液RL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。



Step 1



10-20 mg组织加300 μ l裂解液RL（已加入 β -巯基乙醇），研磨器将组织彻底研磨；向匀浆液中加入590 μ l RNase-free ddH₂O和10 μ l Proteinase K，混匀后56°C处理10-20 min。

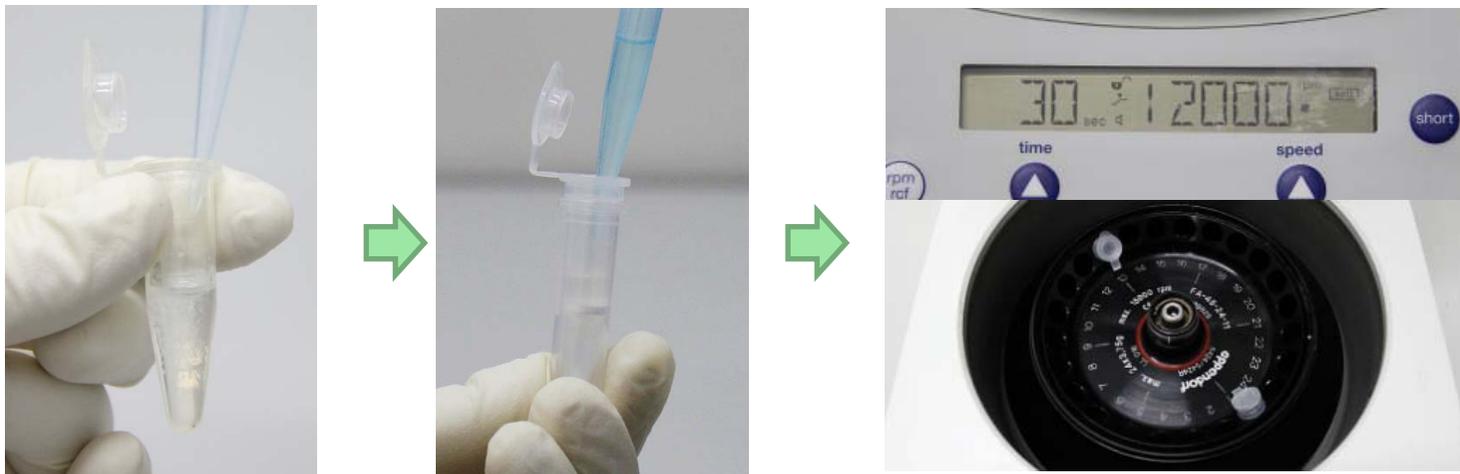
注意：组织量一定不要超过20 mg，否则将导致RNA得率和质量下降。

Step 2



12,000 rpm (~13,400 × g) 离心 2-5 min, 取上清进行以下操作。

Step 3



缓慢加入0.5倍上清体积无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中（吸附柱放在收集管中），12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心30-60 sec，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

Step 4



向吸附柱CR3中加入350 μ l 去蛋白液RW1,
12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心30-60 sec,
弃废液, 将吸附柱放回收集管中。

Step 5



DNase I 工作液的配制：

以一个样品为例：取10 μl DNase I 储存液放入新的 RNase-free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀（用移液枪轻柔吹打混匀）。

如同时提取多个样品，建议混合统一配置DNase I 工作液。如样品较多建议在配置时预留出一定的量，以免因移液器的误差或枪头吸附造成总量不够的情况。

Step 6



向吸附柱CR3中央加入80 μ l
的DNase I 工作液，
室温放置15 min。

Step 7



向吸附柱CR3中加入350 μ l 去蛋白液RW1，
12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心30-60 sec，
弃废液，将吸附柱放回收集管中。

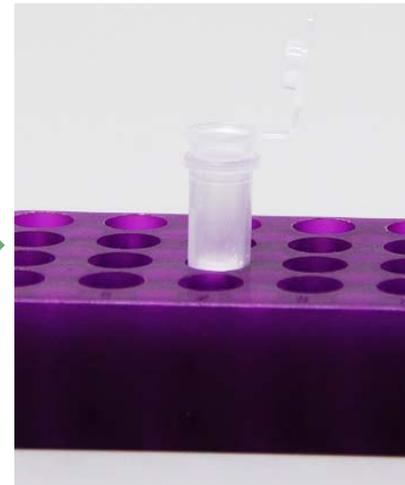
Step 8



向吸附柱CR3中加入500 μ l漂洗液RW
(使用前请先检查是否已加入乙醇)，
室温放置2 min，12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)
离心30-60 sec，倒掉废液，将吸附柱CR3
放回收集管中。

Step 9 重复操作步骤8

Step 10

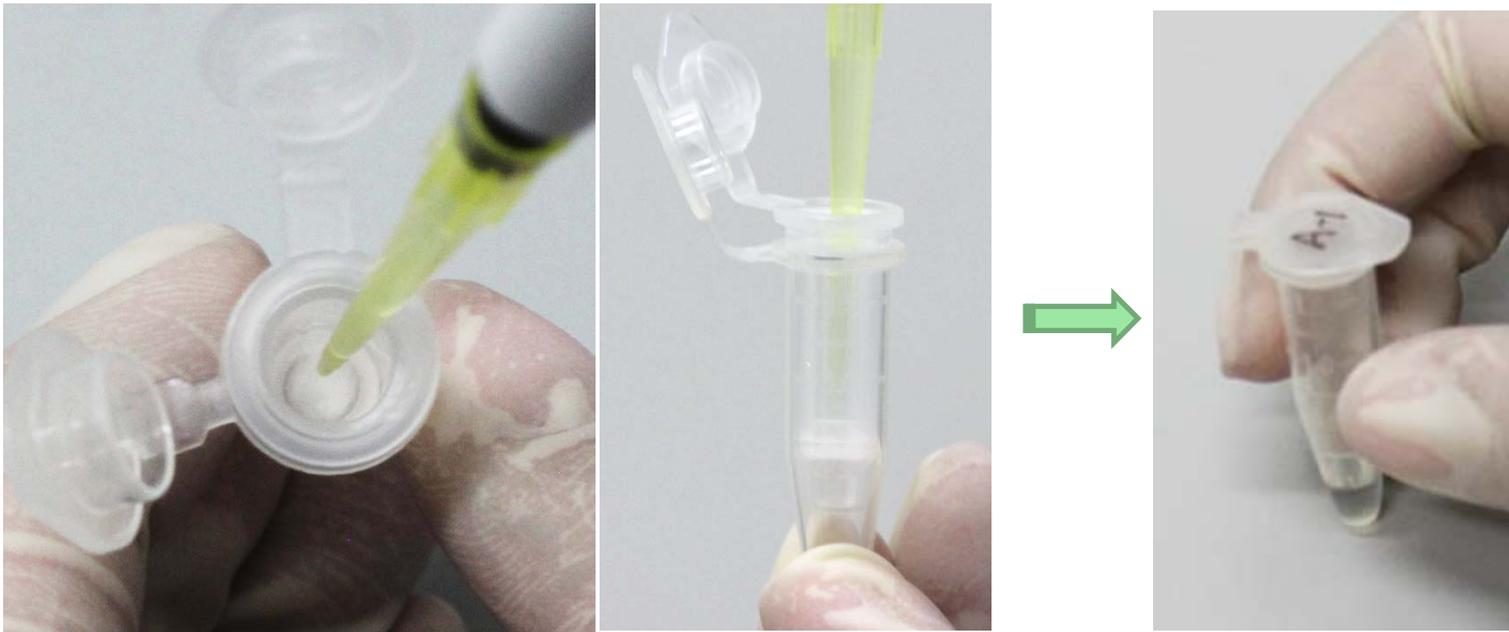


将吸附柱放入新的2 ml 收集管中，
12,000 rpm (~13,400 × g) 离心2 min，去除残余液体。

离心后将吸附柱CR3在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（RT, qPCR等）实验。
但也不要时间过长以免过分干燥核酸不易溶解或RNA降解。

Step 11



将吸附柱CR3转入试剂盒自带的离心管中，加30–100 μl RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，4°C 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心2 min。

洗脱缓冲液体积不应少于30 μl ，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70°C，以防降解。