**细胞和组织RNA核酸免提取试剂盒**

**试剂盒应用**

本试剂盒采用专利裂解液配方在10分钟内完成细胞和组织样本的裂解、提取和纯化。无需使用蛋白酶K、无需低温离心。该配方中含有RNA保护剂，能够抑制RNA降解、保护RNA完整，从而提高RNA产量。提取RNA可用于RT-PCR、RT-qPCR、Northern Blot、分子克隆、文库构建等。

本试剂盒仅供研究使用，不可用于临床、食品、化妆品等领域。

**试剂盒组成**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组分** | **Col-R0101（50T）** | **编号** |
| 裂解液C | 35 mL | Col-R0101A |
| 洗涤液CW1 | 25 mL | Col-R0101B |
| 洗涤液CW2 | 12 mL | Col-R0101C |
| 洗脱液C | 5 mL |  |
| RNA吸附柱 | 50套 | Col-R0101E |

**备注：第一次使用前，在洗涤液CW2中加入48mL无水乙醇，并标记“√”和时间，避免重复加入。**

**保存条件**

室温保存一年。

**自备材料**

水浴锅或金属浴、无水乙醇、1.5mL无RNase离心管、DNase I（2U/μL，或货号QR0102）

**使用方法**

1. **样本处理**

**1.1 从动物组织中提取RNA**

1.1.1 取20-100mg样本放入液氮中充分研磨后，加入700μL裂解液C，颠倒混匀。

或者取20-100mg样本加入700μL裂解液C，加入1颗钢珠，放入组织研磨器中，研磨1-2分钟。

**备注：不同样本中RNA含量差异很大，过多使用样本容易导致堵塞，最终导致RNA提取量下降。**

1.1.2 55℃孵育1分钟。

1.1.3 12,000rpm离心1分钟，取500μL上清。

1.1.4 加入250μL无水乙醇，充分混匀。按照步骤2.1-2.7操作。

**1.2 从悬浮细胞中提取RNA**

1.2.1 细胞1,000rpm离心5分钟，收集细胞沉淀。

1.2.2 细胞数量<5×106个时，加入500μL裂解液C。细胞数量为5×106~1×107个时，加入700μL裂解液C。轻轻吹打混匀。55℃孵育1分钟。

1.2.3 12,000rpm离心1分钟。

1.2.4 细胞数量<5×106个时，取450μL上清。细胞数量为5×106~1×107个时，取650μL上清。

1.2.5 加入0.5倍体积无水乙醇，充分混匀。按照步骤2.1-2.7操作。

**1.3 从贴壁细胞中提取RNA**

1.3.1 胰酶消化细胞后1,000rpm离心5分钟，收集细胞沉淀。

1.3.2 细胞数量<5×106个时，加入500μL裂解液C。细胞数量为5×106~1×107个时，加入700μL裂解液C。轻轻吹打混匀。55℃孵育1分钟。

1.3.3 12,000rpm离心1分钟。

1.2.4 细胞数量<5×106个时，取450μL上清。细胞数量为5×106~1×107个时，取650μL上清。

1.2.5 加入0.5倍体积无水乙醇，充分混匀。按照步骤2.1-2.7操作。

1. **RNA纯化**

2.1全部加入RNA吸附柱中，12,000rpm离心1分钟，倒掉收集管中废液。

2.2 向RNA吸附柱中加入500μL洗涤液CW1，12,000rpm离心30秒，倒掉收集管中废液。

2.3 向RNA吸附柱中加入500μL洗涤液CW2，12,000rpm离心30秒，倒掉收集管中废液。

2.4 重复步骤2.3一次。

2.5 12,000rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。

2.6 将RNA吸附柱放入新1.5mL无RNase离心管中，加入30-50μL洗脱液C，室温放置1分钟。

2.7 12,000rpm离心2分钟，得到RNA溶液，-80℃保存。

**注意事项**

1. 务必在超净台中进行操作，常换手套，防止RNA降解。
2. 尽可能使用新鲜样本进行RNA提取。
3. 使用无DNase无RNase的吸头和离心管，防止RNA降解，常更换吸头，防止交叉污染。
4. 为了提高洗脱效率，可提前将洗脱液C置于65℃水浴后再使用。
5. 根据后续试验需求，请使用DNase I（货号QR0102）进行基因组清除。

**常见问题解析**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **问题** | **可能原因** | **推荐解决方案** |
| RNA吸附柱堵塞 | 1. 上样量太高
2. 加入RNA吸附柱的液体中有固体成分或沉淀物
 | 1. 减少上样量。
2. 增加离心时间。
3. 切勿吸取到可见固体成分。
4. 再次离心。
 |
| RNA得率低 | 1. 未离心下来
2. 样本量太大，裂解不充分
 | 1. 减少样本量。
2. 重复洗脱步骤一次。
 |
| RNA降解 | 1. 样本不新鲜
2. RNA酶污染
 | 1. 使用新鲜样本。
2. 使用保存在样品保存液中样本。
3. 样本保存在-80℃甚至液氮中，尽可能现取现用。
4. 常更换手套。
5. 常更换吸头和离心管。
6. 使用无DNase无RNase的吸头和离心管。
 |