

石蜡包埋组织RNA快速提取试剂盒

货号： NG311S 50次
NG311M 100次

试剂盒组成	保存	50次	100次
裂解液 ML	室温	50 ml	100ml
结合液 RB	室温	15 ml	30ml
漂洗液 RE	室温	25 ml	50ml
漂洗液 RW	室温	15 ml	25ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	20ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O	18ml RNase-free H ₂ O
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
蛋白酶 K (20mg/ml)	室温	20mg	20mgx2
吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套	100 套

产品介绍：

改进的异硫氰酸胍/酚一步法，裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后总 RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗 - 离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的 ML 裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
5. 有效的去除了 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。

注意事项

1. **第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！**
2. 本试剂盒抑制RNA酶效果极佳，所有离心步骤如未加说明，均可在常温进行。
3. 裂解液ML和去蛋白液RE中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
4. 考虑到环保问题，本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，使用前需要自备氯仿。
5. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析RNA的质量。好的RNA产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体RNA带，分别为~5Kb (28S)，~2Kb (18S)，条带亮度比值约为2 : 1。有时候也可以看到~0.1kb和0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到4, 5条带也属于正常现象，如果RNA未成熟的前体或者不均一核RNA、小核RNA提取出来也可能看到介于7Kb和15Kb之间的不连续的高分子量条带。
6. 检测OD₂₆₀/OD₂₈₀吸光度比值时，如需稀释RNA样品应该用TE (PH 8)，如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和PH值低，会使OD₂₈₀升高，从而使比值降低。
7. 加入裂解液RL匀浆后，加氯仿前，样品可在 -60°C-70°C 保存一个月以上。

操作步骤：(实验前请先阅读注意事项)**提示：**第一次使用前请先在漂洗液RW瓶和70%乙醇瓶中加入指定量乙醇!

1. 将石蜡包埋的组织切成 5-10 μm 的薄片 5-7 片后置于 1.5ml 离心管中。
2. 加入 1ml 二甲苯，涡旋振荡 10 秒。
3. 室温 12,000rpm 离心 2min。去掉上清液，小心不要去掉沉淀。
4. 加入 1ml 无水乙醇，涡旋混匀，室温 12,000rpm 离心 2min。
5. 去掉上清液，小心不要去掉沉淀。室温晾干 10min 或直至残留的乙醇已挥发完全。
6. 加入 240 μl 溶液 RB 和 10 μl 蛋白酶 K 溶液，涡旋混匀。55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15min，再 80 $^{\circ}\text{C}$ 15min。
7. 加入 750 μl 裂解液 ML，涡旋混匀，室温放置 2min。
8. 加入 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡 15 秒并将其在室温下孵育 3 分钟。
9. 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12,000rpm 离心 10 分钟，样品会分成三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相，RNA 存在于水相中。把水相（约 600 μl ）转移到新管中，进行下一步操作。
10. 加入等体积 70% 乙醇（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），颠倒混匀（此时可能会出现沉淀）。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中（吸附柱套在收集管内，溶液太多可分次过柱）。
11. 10,000rpm 离心 45 秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
12. 加 500 μl 去蛋白液 RE，12,000rpm 离心 45 秒，弃掉废液。
13. 加入 700 μl 漂洗液 RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
14. 加入 500 μl 漂洗液 RW，12,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
15. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，掀开离心柱盖，12,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
16. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，加入 30 μl RNase free water（事先在 65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热效果更好），室温放置 2 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。收集得到纯净 RNA 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 或者更低。
洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 RNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于 30 μl ，体积过小降低 RNA 洗脱效率，减少 RNA 产量。