

GeneJET™ RNA 纯化试剂盒

#K0731, #K0732

分析证明书

#K0731

Lot

质量控制

按照操作手册操作，GeneJET™ RNA Purification Kit 可从 20mg 小鼠肌肉或心脏中分离 RNA。纯化的 RNA 的 A260/280 比值≥1.9。从小鼠肌肉或心脏中纯化的 RNA 的 RNA 分子完整性指数（RIN）分别是>7 和>8。纯化的 RNA 的功能质量是通过小鼠肌营养不良蛋白 RNA 的 RT-PCR 得到 13.3 kb 的 PCR 产物的方法来评测。

质量认证人：Jurgita Zilinskiene

内容	页码	内容	页码
试剂盒组分.....	2	C. 人类血细胞总 RNA 抽提.....	9
存储条件.....	2	D. 细菌总 RNA 抽提.....	9
产品说明.....	2	E. 酵母总 RNA 抽提.....	10
实验原理.....	2	附加操作步骤.....	12
注意事项.....	3	从制备的 RNA 中去除基因组 DNA.....	12
需要的其他材料和设备.....	5	RNA 净化操作步骤.....	12
RNA 提纯操作步骤.....	6	问题分析与解决.....	13
A. 哺乳动物组织和昆虫总 RNA 抽提.....	6	参考文献.....	14
B. 哺乳动物培养细胞总 RNA 抽提.....	7		

试剂盒组分

GeneJET™ RNA 提取试剂盒	50 preps #K0731	250 preps #K0732
蛋白酶 K	600 µl	5×600 µl
裂解液	40ml	200ml
冲洗液 1（浓缩的）	40ml	200ml
冲洗液 2（浓缩的）	20ml	100ml
无 RNA 酶高纯水	30ml	125ml
可配收集管的 GeneJET™ RNA 纯化柱	50	50
收集管 (2ml)	50	50
收集管 (1.5ml)	50	50

存储条件

蛋白酶 K 于-20℃ 保存，其它组分室温保存 (15-25℃)

产品说明

GeneJET™ RNA 提取试剂盒是一个简单高效地从哺乳动物细胞、组织、人血液细胞、酵母和细菌中纯化总 RNA 的系统。该试剂盒采用基于硅膜技术的便捷型离心柱，无需冗长的氯化铯梯度离心，醇沉淀或有毒的酚氯仿抽提过程。

在裂解完成后，15 分钟内即可用 GeneJET™ RNA 提取试剂盒提取片段长度大于 200 个核苷酸的 RNA。纯化的高品质 RNA 能广泛应用于多种下游应用：如 RT-PCR，RT-qPCR，Northern 杂交及其他基于 RNA 的分析。见表 1. 从不同原料提取的典型总 RNA 产量。

实验原理

样品用裂解液裂解和匀浆。该裂解液含有硫氰酸胍，硫氰酸胍是一种保护 RNA 免受内源性 RNA 酶降解的离液盐溶液（1）。裂解后的混合溶液与乙醇混合后加到纯化柱上。当裂解液离心通过纯化柱时，离液溶液和乙醇使 RNA 结合在硅膜上（2）。随后用冲洗液清洗纯化柱以除去膜上的杂质。最后纯的 RNA 在低离子强度的情况下用无 RNA 酶水洗脱出来。

表 1. 从不同原料提取的典型总 RNA 产量

原料	质量	产量, μg
小鼠心脏	20mg	10-15
小鼠肌肉	30 mg	8-10
小鼠肺	30 mg	25-30
小鼠肾脏	30 mg	25-30
小鼠肝脏	30 mg	60-65
小鼠脾脏	5 mg	10-15
<i>Bacillus pumilis</i> 细胞	1×10^9 cells	15-20
<i>Escherichia coli</i> 细胞	1×10^9 cells	25-30
HeLa 细胞	1×10^6 cells	35-40
Jurkat 细胞	1×10^6 cells	40-50
Cos7 细胞	1×10^6 cells	20-25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 细胞	1×10^8 cells	150-160

注意事项

缓冲液制备及处理

使用前要将乙醇 (96-100%) 按照表中的比例与**冲洗液 1**（浓缩的）和**冲洗液 2**（浓缩的）混合。

	50 preps (#K0731)		250 preps (#K0732)	
	冲洗液 1	冲洗液 2	冲洗液 1	冲洗液 2
浓缩的冲洗液	40ml	20ml	200ml	100ml
乙醇 (96-100%)	10ml	34ml	50ml	170ml
总量	50ml	54ml	250ml	270ml

加入乙醇后，在瓶盖上做标记表明该步骤已完成。

- RNA 提取实验开始前，准备足量的含有 β -巯基乙醇或 DTT 的**裂解液**。每 1ml **裂解液**中加入 20 μl 浓度为 14.3M 的 β -巯基乙醇或 20 μl 浓度为 2M 的 DTT。
- **裂解液**每次使用前检查有无盐沉淀，如有沉淀则在使用前先将溶液加热到 37°C 使沉淀物溶解，再冷却至 25°C 备用。
- 使用**裂解液**和**冲洗液 1**时要戴手套，因为这些溶液中含有刺激性物质，直接接触，呼吸或吞噬会造成伤害。

避免 RNA 酶污染

RNA 纯度和完整性对于下游应用至关重要。RNA 可被 RNA 酶 A 降解，这是一种在实验室环境中常见的非常稳定的污染物。注意不要将 RNA 酶带到 RNA 纯化的过程中去，尤其是在用冲洗液 2 清洗

纯化柱和洗脱 RNA 的步骤中。

避免 RNA 酶污染的一般性建议：

- 制备试剂和 RNA 样本时戴上手套，因为皮肤是一种常见的 RNA 酶来源。经常更换手套。
- 使用无菌，一次性无 RNA 酶的吸头。
- 选用适当的试剂，以消除非一次性用品（移液器，离心机）和工作台上 RNA 酶的污染。
- 在不使用时将所有试剂盒组分保持密封状态。使用完后立即将瓶口关闭。

原料的处理和储存

- 从新鲜样本中纯化 RNA 时，取样后立即将样本放置在冰上。裂解和匀浆操作进行得越快越好。
- 如样本是从已经宰杀的动物或尸体上获得，应尽量减少从死亡到样品采集的时间以分离出高质量的 RNA。
- 取样后如果不能立即纯化 RNA，则将组织样本用液氮冷冻后储存在-70°C。冷冻组织样本在处理或称量过程中不能解冻。

- 动物和细菌细胞可以离心后储存在-70°C备用。但如果用酶裂解法从酵母细胞中纯化 RNA，则只

能使用新鲜样本。

- 血液样本收集和血细胞的 RNA 纯化应在同一天进行。样本可在 4°C 保存备用。不要冷冻血液样本。

需要的其他材料和设备

- 微量移液器和无菌、无 RNA 酶的吸头
- 涡旋式混合仪
- 微型离心机
- 微量离心管
- 多头抽真空装置
- 一次性手套
- 样品破碎和匀浆设备（依据实验方案选择）
 - 研钵和杵
 - 转子-定子式匀浆器
 - 钝针头和注射器
- 14.3M β -巯基乙醇或 2M DTT
- 乙醇（96-100%）

缓冲液

针对制备哺乳动物培养细胞裂解液：

PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 2mM KH_2PO_4 , pH 7.4)。

针对制备革兰氏阳性菌裂解液：

TE buffer (10mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) containing lysozyme (终浓度 0.4mg/ml)。

针对制备酵母裂解液：

Yeast lysis buffer (1M 山梨醇, 0.1M EDTA, pH 7.4。使用前加入 0.1% β -巯基乙醇和 50U 溶壁酶或者溶壁酶 20T)。

针对蛋白酶 K 的稀释：

TE buffer (10mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)。

RNA 提纯操作步骤

哺乳动物培养细胞、组织、昆虫、人血液、细菌和酵母的 RNA 纯化操作请见 6~10 页。

A. 哺乳动物组织和昆虫的总 RNA 抽提

在开始前：

- 准备足量的 β -巯基乙醇或 DTT 裂解缓冲液：每毫升缓冲液加入 20 μ l 的 14.3M β -巯基乙醇或 2M DTT。
- 准备足量的蛋白酶 K 溶液：用 590 μ l 的 TE buffer (10mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) 稀释 10 μ l 蛋白酶 K（试剂盒中含有）。

步骤	实验操作
1	称取一定重量的组织（最多到 30mg 的新鲜或冷冻组织），或取昆虫并按以下方法之一破碎： a) 用研钵-杵破碎： 将 30mg 组织（用最多 10mg 的脾组织）或者将昆虫浸入液氮中，然后用研钵和杵将其充分碾碎。<u>立即</u>将其粉末转移到盛有 300μl 含 β-巯基乙醇或 DTT 裂解液的 1.5ml 微量离心管（试剂盒中不提供）中。涡旋振荡 10 秒以混匀。 注意 • 将组织或昆虫粉末转入裂解液时速度一定要快。不将粉末浸入裂解液会导致 RNA 降解。 • 研磨后的组织和昆虫应直接用于 RNA 纯化试验，不可用于保存。 • 所有研磨后的材料必须与裂解液全部混匀，不能将未与裂解液混合的材料留在管壁上（一样会导致 RNA 降解）。 用转子-定子式匀浆器匀浆裂解液或者用连有 20 号钝针头的无 RNA 酶的注射器反复抽吸裂解液。 b) 使用转子-定子匀浆器破碎和匀浆。 适宜大小的容器中放入 300μl 含 β-巯基乙醇或 DTT 的裂解液，将 30mg 组织（用最多 10mg 的脾组织）或昆虫置于其中，<u>立即</u>用传统的转子-定子匀浆器破碎原料 20—40 秒或破碎原料到溶液呈均一的状态。
2	加入 600μl 的蛋白酶 K 稀释液（10μl 蛋白酶 K 用 590 μl 的 TE buffer 稀释）。涡旋振荡混匀 后在 15—25°C 下孵育 10 分钟。
3	以 $\geq 12000 \times g$ 离心 5 分钟（<10mg 起始材料）或 10 分钟（>10mg 起始材料）。将上清转移到一个新的无 RNA 酶的微量离心管中（试剂盒中不提供）。
4	加入 450μl 乙醇（96%—100%），用吸头上下吸取混匀。

5	将多至 700μl 裂解液加到带有收集管的 GeneJET™ RNA 纯化柱中。≥12000 x g 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。重复以上步骤，直到所有裂解液都已加到纯化柱上且被离心，弃掉含有穿柱液的收集管，换成新的 2ml 收集管（试剂盒中含有）。
6	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 700μl 的冲洗液 1（带补加的乙醇，见第 3 页），≥12000 x g 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。
7	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 600μl 的冲洗液 2（带补加的乙醇，见第 3 页），≥12000 x g 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。
8	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 250μl 的冲洗液 2，≥12000 x g 离心 2 分钟。 <i>可选步骤：</i> 如果纯化柱中还有液体残留，倒空收集管，将纯化柱重新放入收集管中，以最大转速再次离心 1 分钟。 弃掉含有穿柱液的收集管，将纯化柱重新放入无菌无核酸酶的 1.5ml 微量离心管中(试剂盒中含有)。
9	加 100μl 无核酸酶的水到 GeneJET™ RNA 纯化柱的膜中心。≥12000 x g 离心 1 分钟以洗脱 RNA。 注意 90%的 RNA 在第一步洗脱过程中洗脱下来，为了得到更大的 RNA 产量，可再加入 100μl 的无酶水重复上步。 - 如果需要高浓度 RNA 或者提取 RNA 的材料本身量就比较少（比如，< 5mg），第一步和第二步的洗脱步骤中，加入的无核酸酶的水体积可减到 50μl。需要注意的是洗脱液的用量越少可能会导致洗脱下来的 RNA 的量也越少。
10	弃掉纯化柱。可将纯化的 RNA 直接用于下游实验或者储存于 -20°C 或 -70°C 中备用。

B. 哺乳动物培养细胞总 RNA 抽提

在开始前：

- 在细胞裂解液中加入 β-巯基乙醇或 DTT。每毫升细胞裂解液中加入 20μl 的 14.3M β-巯基乙醇或 2M DTT。

步骤	实验操作
1	a) 悬浮细胞 取多至 1×10^7 个细胞于大小合适的离心管中，250 x g 离心 5 分钟。弃掉上清。用 PBS 冲洗细胞一次以除掉残余培养基。重复离心步骤，去掉上清。 b) 贴壁细胞 倒掉培养基（用多至 5×10^6 个细胞），用 PBS 冲洗细胞，去除掉残余培养基。采用在适量的 PBS 中刮除细胞的方法或用胰酶消化的方法将细胞从细胞培养皿上剥离，将细胞置于微量离心管中（试剂盒中不提供），250 x g 离心 5 分钟，弃掉上清。 注意：离心之后的细胞泥沉淀可以直接提取 RNA 或者储存在 -70°C 备用。
2	加入 600μl 含有 β-巯基乙醇或者 DTT 的裂解液，将 1a 或 1b 中得的细胞泥重悬，涡旋振荡

	10 秒混匀。 注意 • 如果加入裂解液后，得到粘稠的混合液，必要时需将样品匀浆。使用转子-定子式匀浆器匀浆 30 秒或者用连有 20 号钝针头无 RNA 酶注射器反复抽吸。不充分的匀浆会导致 RNA 产量降低。 • 如果样品中出现了任何细胞碎片，将管子 14000 x g 离心 5 分钟，将上清转移到一个新的无 RNA 酶的微量离心管中（试剂盒中不提供）。
3	加入 360μl 96%-100%乙醇，用吸头上下吸取混匀。
4	将多至 700μl 裂解液加入带有收集管的 GeneJET™ RNA 纯化柱中。≥12000 x g 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。 重复以上步骤，直到所有裂解液都已加到纯化柱上且被离心，弃掉含有穿柱液的收集管，换成新的 2ml 收集管（试剂盒中含有）。
5	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 700μl 的冲洗液 1（带补加的乙醇，见第 3 页），≥12000 x g 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。
6	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 600μl 的冲洗液 2（带补加乙醇，见第 3 页），≥12000 x g 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。
7	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 250μl 的冲洗液 2，≥12000 x g 离心 2 分钟。 <i>可选步骤：</i> 如果纯化柱中还有液体残留，倒空收集管，将纯化柱重新放入收集管中，以最大转速再次离心 1 分钟。 弃掉含有穿柱液的收集管，将纯化柱重新放入无菌无核酸酶的 1.5ml 微量离心管中（试剂盒中含有）。
8	加 100μl 无核酸酶的水（试剂盒中含有）到 GeneJET™ RNA 纯化柱的膜中心。≥12000 x g 离心 1 分钟以洗脱 RNA。 注意 • 大于 90%的 RNA 在第一步洗脱过程中洗脱下来，为了得到更大的 RNA 产量，可再加入 100μl 无核酸酶的水重复上步。 • 如果需要高浓度 RNA 或者提取 RNA 的材料本身量就比较少（比如，< 1x10⁶ 细胞），第一步和第二步的洗脱过步骤中，加入的无核酸酶的水体积可减到 50μl。需要注意的是洗脱液的用量越少可能会导致洗脱下来的 RNA 的量也越少。
9	弃掉纯化柱。可将纯化的 RNA 直接用于下游实验或者储存于 -20°C 或 -70°C 中备用。

C. 人类血液细胞总 RNA 抽提

在开始前：

- 在裂解液中补加入 β -巯基乙醇或 DTT。每毫升裂解液中加入 20 μ l 的 14.3 M β -巯基乙醇或 2 M DTT
- 收集血液样本和提取 RNA 必须同天进行。血液样本要存储于 4°C，不要冷冻血液样本！

步骤	实验操作
1	取 0.5ml 全血，4°C 400 x g 离心 5 分钟，收集血细胞。血细胞会形成大约占总样本体积的 60-70%的沉淀。用移液器小心从沉淀上吸走上清（血浆）。
2	血细胞沉淀中加入 600 μ l 含有 β -巯基乙醇或 DTT 的裂解液。涡旋振荡或者用吸头反复吸取混匀。
3	加入 450 μ l 96%-100%乙醇，用吸头上下吸取混匀样品。
4	将多至 700 μ l 裂解液加入带有收集管的 GeneJET™ RNA 纯化柱中。 $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。 重复以上步骤，直到所有裂解液都已加到纯化柱上且被离心，弃掉含有穿柱液的收集管，换成新的 2ml 收集管（试剂盒中含有）。
5	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 700 μ l 的冲洗液 1（带补加的乙醇，见第 3 页）， $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。
6	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 600 μ l 的冲洗液 2（带补加乙醇，见第 3 页）， $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。
7	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 250 μ l 的冲洗液 2， $\geq 12000 \times g$ 离心 2 分钟。 <i>可选步骤：</i> 如果纯化柱中还有液体残留，倒空收集管，将纯化柱重新放入收集管中，以最大转速再次离心 1 分钟。 弃掉含有穿柱液的收集管，将纯化柱重新放入无菌无核酸酶的 1.5ml 微量离心管中（试剂盒中含有）。
8	加 50 μ l 无核酸酶的水(试剂盒中含有)到 GeneJET™ RNA 纯化柱的膜中心。 $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟以洗脱 RNA。
9	弃掉纯化柱。可将纯化的 RNA 直接用于下游实验或者储存于 -20°C 或 -70°C 中备用。

D. 细菌总 RNA 抽提

注意事项

提取 RNA 所用细菌需处于对数增长期（OD₆₀₀=0.5-1）。不要使用过夜培养的细菌来提取 RNA。

在开始前：

- TE buffer (10mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)中补加溶菌酶（试剂盒中未提供）至终浓度 0.4mg/ml。
- 在裂解液中补加入 β -巯基乙醇或 DTT。每毫升裂解液中加入 20 μ l 的 14.3M β -巯基乙醇或 2M DTT。

步骤	实验操作
1	将 1.5ml 革兰氏阴性菌或者阳性菌的培养液(1×10^9 个细胞)放入 1.5ml 微量离心管中。 $\geq 12000 \times g$ 离心 2 分钟收集细胞。尽可能多的吸取上清，此步需小心操作。
2	加入 100 μ l 新鲜配置的含有溶菌酶（终浓度 0.4mg/ml）的 TE buffer。反复颠倒离心管混匀。
3	15-25 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟。
4	加入 300 μ l 含有 β -巯基乙醇或 DTT 的裂解液。涡旋振荡 15 秒混匀直到形成均一混合液。
5	加入 180 μ l 96%-100%乙醇，用吸头上下吸取混匀。
6	将多至 700 μ l 裂解液加入带有收集管的 GeneJET TM RNA 纯化柱中。 $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。 重复以上步骤，直到所有裂解液都已加到纯化柱上且被离心，弃掉含有穿柱液的收集管，换成新的 2ml 收集管（试剂盒中含有）
7	GeneJET TM RNA 纯化柱中加入 700 μ l 的冲洗液 1（带补加的乙醇，见第 3 页）， $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。
8	GeneJET TM RNA 纯化柱中加入 600 μ l 的冲洗液 2（带补加乙醇，见第 3 页）， $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。
9	GeneJET TM RNA 纯化柱中加入 250 μ l 的冲洗液 2， $\geq 12000 \times g$ 离心 2 分钟。 <i>可选步骤：</i> 如果纯化柱中还有液体残留，倒空收集管，将纯化柱重新放入收集管中，以最大转速再次离心 1 分钟。 弃掉含有穿柱液的收集管，将纯化柱重新放入无菌无核酸酶的 1.5ml 微量离心管中（试剂盒中含有）。
10	加 100 μ l 无核酸酶的水（试剂盒中含有）到 GeneJET TM RNA 纯化柱的膜中心。 $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟以洗脱 RNA。 注意 • 大于 90% 的 RNA 在第一步洗脱过程中洗脱下来，，为了得到更大的 RNA 产量，可再加入 100μl 无核酸酶的水重复上步。 • 如果需要高浓度 RNA 或者提取 RNA 的材料本身量就比较少（比如，$< 1 \times 10^6$ 细胞），第一步和第二步的洗脱过步骤中，加入的无核酸酶的水的体积可减到 50μl。需要注意的是洗脱液的用量越少可能会导致洗脱下来的 RNA 的量也越少。
11	弃掉纯化柱。可将纯化的 RNA 直接用于下游实验或者储存于 -20 $^{\circ}$ C 或 -70 $^{\circ}$ C 中备用。

E. 酵母总 RNA 抽提

注意事项

提取 RNA 所用酵母需处于对数增长期（OD₆₀₀=0.5-1），不要使用过夜培养的酵母来提取 RNA。

使用含酶裂解法（见下文）破碎细胞时只能用新鲜培养的细胞。

在开始前：

- 准备酵母裂解液：1M 山梨醇, 0.1M EDTA, pH 7.4。使用前加入 0.1% β -巯基乙醇和 50 个单位的溶细胞壁酶或者酶解酶 20T。
- 在裂解液中补加入 β -巯基乙醇或 DTT。每毫升裂解液中加入 20 μ l 的 14.3M β -巯基乙醇或 2M DTT
- 准备足量的蛋白酶 K 溶液：用 590 μ l 的 TE buffer (10mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) 稀释 10 μ l 蛋白酶 K（试剂盒中含有）。

步骤	实验操作
1	取含有多至 4×10^8 个酵母细胞的培养基到 1.5ml 微量离心管中。 $\geq 12000 \times g$ 离心 2 分钟收集细胞。弃掉上清。
2	100 μ l 的酵母裂解液重悬上步得到的细胞沉淀。
3	30°C 孵育 30 分钟。
4	细胞沉淀中加入 300 μ l 含有 β -巯基乙醇或 DTT 的裂解液。涡旋振荡或用吸头上下吸取混匀。
5	加入 600 μ l 的蛋白酶 K 稀释液（10 μ l 蛋白酶 K 用 590 μ l 的 TE buffer 稀释）。涡旋振荡混匀后在 15—25°C 下孵育 10 分钟。
6	$\geq 12000 \times g$ 离心 10 分钟。取上清放入一个新的无 RNA 酶的微量离心管中（试剂盒不提供）。
7	加入 450 μ l 96%-100%乙醇，用吸头上下吸取混匀。
8	将多至 700 μ l 裂解液加到带有收集管的 GeneJET™ RNA 纯化柱中。 $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。重复以上步骤，直到所有裂解液都已加到纯化柱上且被离心，弃掉含有穿柱液的收集管，换成新的 2ml 收集管（试剂盒中含有）。
9	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 700 μ l 的冲洗液 1（带补加的乙醇，见第 3 页）， $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。
10	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 600 μ l 的冲洗液 2（带补加的乙醇，见第 3 页）， $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟。弃掉穿柱液，将纯化柱重新放入收集管中。
11	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 250 μ l 的冲洗液 2， $\geq 12000 \times g$ 离心 2 分钟。 <i>可选步骤：</i> 如果纯化柱中还有液体残留，倒空收集管，将纯化柱重新放入收集管中，以最大转速再次离心 1 分钟。 弃掉含有穿柱液的收集管，将纯化柱重新放入无菌无核酸酶的 1.5ml 微量离心管中(试剂盒中含有)。
12	加 100 μ l 无核酸酶的水到 GeneJET™ RNA 纯化柱的膜中心。 $\geq 12000 \times g$ 离心 1 分钟以洗脱

	RNA。 注意 • 大于 90%的 RNA 在第一步洗脱过程中洗脱下来，，为了得到更大的 RNA 产量，可再加入 100μl 无酶水重复上步。 • 如果需要高浓度 RNA 或者提取 RNA 的材料本身量就比较少（比如，< 5 mg），第一步和第二步的洗脱步骤中，加入的无核酸酶的水体积可减到 50μl。需要注意的是洗脱液的用量越少可能会导致洗脱下来的 RNA 的量也越少。
13	弃掉纯化柱。可将纯化的 RNA 直接用于下游实验或者储存于-20°C 或-70°C 中备用。

附加的操作步骤

从制备的 RNA 中去除基因组 DNA

步骤	实验操作								
1	将下列组分加入到无核酸酶的管子中： <table> <tr> <td>RNA</td><td>1 µg</td></tr> <tr> <td>10X reaction buffer with MgCl₂</td><td>1 µl</td></tr> <tr> <td>无 RNA 酶的 DNA 酶 I (#EN0521)</td><td>1 µl (1 u)</td></tr> <tr> <td>DEPC 处理水 (#R0601)</td><td>至 10 µl</td></tr> </table> 37°C 下孵育 30 分钟。 注意： RiboLock™ RNA 酶抑制剂 (#EO0381), 1 u/µl, 可加在反应混合物中防止 RNA 降解。	RNA	1 µg	10X reaction buffer with MgCl ₂	1 µl	无 RNA 酶的 DNA 酶 I (#EN0521)	1 µl (1 u)	DEPC 处理水 (#R0601)	至 10 µl
RNA	1 µg								
10X reaction buffer with MgCl ₂	1 µl								
无 RNA 酶的 DNA 酶 I (#EN0521)	1 µl (1 u)								
DEPC 处理水 (#R0601)	至 10 µl								
2	加入 1µl 50mM EDTA, 65°C 孵育 10 分钟以失活 DNA 酶 I。由于在含有二价阳离子而缺乏螯合剂的加热环境中, RNA 会水解, EDTA 的加入是需要的。 另外可使用 GeneJET™ RNA 纯化试剂盒(见第 15 页 RNA 净化操作步骤)或者进行酚/氯仿抽提。								
3	使用制备好的 RNA 做下游实验。								

注意

- 每 1µg RNA 不要使用超过 1 u 的 DNA 酶 I。
- 反应混合物和 50mM EDTA 溶液的体积可以成比例放大以制备更多的 RNA。建议 RNA 的终浓度为 0.1µg/µl。

RNA 净化操作步骤

GeneJET™ RNA Purification Kit 可用于纯化经 DNA 酶 I 或者其他酶消化后的 100µg RNA。

步骤	实验操作
1	加入无核酸酶的水(试剂盒中含有)将反应混合物体系补齐至 100ul。加入 30ul <u>不含有</u> β-巯基乙醇或 DTT 的裂解液。涡旋振荡或用吸头上下吸取混匀。
2	加入 180µl 96%-100%乙醇, 用吸头上下吸取混匀。
3	混合物加入带有收集管的 GeneJET™ RNA 纯化柱中。≥12000 x g 离心 1 分钟。弃掉含有穿柱液的收集管, 换成新的 2ml 收集管(试剂盒中含有)。
4	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 700µl 的冲洗液 1 (带补加的乙醇, 见第 3 页), ≥12000 x g 离心 1 分钟。弃掉穿柱液, 将纯化柱重新放入收集管中。
5	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 600µl 的冲洗液 2 (带补加的乙醇, 见第 3 页), ≥12000 x g 离心 1 分钟。弃掉穿柱液, 将纯化柱重新放入收集管中。
6	GeneJET™ RNA 纯化柱中加入 250µl 的冲洗液 2, ≥12000 x g 离心 2 分钟。 <i>可选步骤:</i> 如果纯化柱中还有液体残留, 倒空收集管, 将纯化柱重新放入收集管中, 以最大转速再次离心 1 分钟。

	弃掉含有穿柱液的收集管，将纯化柱重新放入无菌无核酸酶的 1.5ml 微量离心管中(试剂盒中含有)。
7	加 50μl 无核酸酶的水到 GeneJET™ RNA 纯化柱的膜中心。≥12000 x g 离心 1 分钟以洗脱 RNA。 注意： 为了最大化 RNA 产量，加 50μl 无核酸酶的水重复以上步骤一次。
8	弃掉纯化柱。可将纯化的 RNA 直接用于下游实验或者储存于-20°C 或 -70°C 中备用。

问题分析与解决

存在问题	原因和解决办法
RNA 产量低	起始材料使用量过大 减少起始材料用量。不要使用超过裂解操作步骤中提到的组织或者细胞的量。 起始材料没有完全破碎 减少起始材料用量，提高破碎时间。 裂解产物中没有加乙醇 确保裂解产物在加入纯化柱前加入乙醇。 冲洗液 1 和 2 中没有加乙醇 确保冲洗液 1 和 2 在使用前中加入了乙醇。依据第 3 页冲洗液准备细节进行操作。
RNA 降解	起始材料处理不当 对于新鲜材料，取得后马上置于冰上。随后的裂解和匀浆操作要尽可能地快。确保冷冻的样品是在收集到样品后马上置于液氮中并-70°C 保存的。在加入裂解液前要避免样品融化。 RNA 酶污染 为避免 RNA 酶污染，整个实验操作过程中要戴手套，并经常更换。使用一次性的无菌无核酸酶的吸头。清除重复使用的器具和工作台表面的 RNA 酶的污染。
DNA 污染	使用 DNA 酶 I (#EN0521) 处理 RNA 样品。可采用以下几种方法使 DNA 酶 I 失活：加热（螯合剂存在下）、酚/氯仿抽提或者采用 RNA 净化步骤（见第 12 页）以重新纯化 RNA。
纯化柱堵塞	起始材料使用量过大 减少起始材料用量。不要使用超过裂解操作步骤中指示的组织或者细胞的量。 起始材料没有完全破碎 减少起始材料用量，提高破碎时间。 裂解产物加入纯化柱之前没有去除组织碎片 (动物组织和昆虫总 RNA 提取操作步骤) 加入纯化柱之前，将裂解产物离心以去除掉组织碎片

酶促反应进行不好	乙醇残留在洗脱的 RNA 中 如果用冲洗液 2 冲洗后,纯化柱中能看见残余溶液。倒空收集管,以最大速度($\geq 12000 \times g$)重新离心纯化柱 1 分钟。 盐残留在洗脱的 RNA 中 按照正确顺序使用冲洗液。先用冲洗液 1 冲洗柱子,再用冲洗液 2。
----------	--

参考文献

1. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159
2. Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E.W. Dillen, and J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495–503.

GeneJET 是 Fermentas 的商标

产品使用限制说明

本产品用于体外科学研究之用,不可用于诊断或者药物研发,也不可用于人类或者动物体。

请登录 www.fermentas.com 查询此产品材料安全数据表。