

For research use only

Version Number: 3.0

Cell Total RNA Isolation Kit

For total RNA purification from cultured cells: 10⁴ ≤ Cultured Cells ≤ 10⁶

试剂盒组成	RE-03111	RE-03113
	50 T	200 T
Buffer cRL1*	25 mL	100 mL
Buffer cRL2	15 mL	60 mL
Buffer RW1*	25 mL	100 mL
Buffer RW2	24 mL	96 mL
RNase-Free ddH ₂ O	10 mL	40 mL
RNA-Only Column	50 套	200 套
DNA-Cleaning Column	50 套	200 套
说明书	1 份	1 份

*: Buffer cRL1、Buffer RW1 中含有具刺激性的离液盐，操作时请注意佩戴口罩、手套及其他相关防护措施。

产品简介

该试剂盒采用本公司研制的离心柱和配方，可以高效率的从 96、24、12、6 孔板培养细胞中提取得到高纯度高质量的总 RNA。试剂盒提供的高效 DNA-Cleaning Column，能轻松的让上清液和细胞裂解物分离并吸附除去基因组 DNA，操作简便、省时；RNA-Only Column 能高效的结合 RNA，搭配独特的配方，可以同时处理大量样品。

产品应用

该试剂盒适用于从 96、24、12、6 孔板培养细胞提取纯化总 RNA。提取得到的总 RNA 可用于各种下游分子实验，例如：cDNA 合成、RT-PCR、Real Time PCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译、芯片分析、PolyA 筛选、分子克隆和 RNase 保护分析等。

储存条件

❖ 本试剂盒在常温(15–25°C)避光干燥条件下，可保存 24 个月。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 如提取的 RNA 用于克隆全长 cDNA，每 1 mL Buffer cRL1 加入 10 μL β-巯基乙醇(建议现配现用)，Buffer cRL1 在加入β-巯基乙醇后可在 4°C 放置 1 个月。

如提取的 RNA 仅用于 qPCR 或测序分析等其他下游操作，可以选择不加β-巯基乙醇，不会影响提取效果。
- ❖ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行(包括离心)，切勿使用冰浴和低温(4°C)离心。
- ❖ 样品应尽量选择新鲜样本，冻存样本避免反复冻融，否则会导致提取的 RNA 降解或产量降低。
- ❖ 试剂盒使用前，请在 **Buffer cRL2** 中添加无水乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。
- ❖ 试剂盒使用前，请在 **Buffer RW2** 中添加无水乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。
- ❖ RNA 产率和质量与细胞样本用量和洗脱体积有关，建议每 250 μL Buffer cRL1 使用细胞的量不超过 5×10⁶。洗脱液体积请勿少于 20 μL，否则会影响 RNA 回收效率。
- ❖ 请检查试剂盒中的 Buffer cRL1 和 Buffer RW1 是否有**晶体析出**现象，若有晶体析出（通常为环境温度过低导致），可将 Buffer 放置于室温或 37°C 一段时间，待晶体溶解后混匀再使用。

材料取用说明

❖ 培养细胞：单次处理，用量请勿超过 5×10⁶。

操作步骤(全程常温(15-25°C)操作，切勿冰浴和低温离心)

使用前请先在 Buffer cRL2 和 Buffer RW2 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

请检查试剂盒中的 Buffer cRL1 和 Buffer RW1 是否有晶体析出现象，若有晶体析出（通常为环境温度过低导致），可将 Buffer 放置于室温或 37°C 一段时间，待晶体溶解后混匀再使用。

1. 根据培养方式不同按以下说明进行细胞裂解。
 - a 贴壁细胞: 将培养皿倾斜约 30°, 使用移液器或移液管缓慢吸去培养基, 务必彻底吸除干净。加入 **Buffer cRL1**(加入量见下表)进行消化、裂解(将 Buffer cRL1 完全覆盖培养皿，倾斜培养皿，使用移液器将细胞全部吹打下来); 或者使用胰酶消化细胞，离心收集细胞后参照下表加入 **Buffer cRL1**(加入量见下表)，用移液器反复吹打混匀(直到看不到细胞团为止)。

注意：务必将细胞培养皿中的液体彻底吸除干净，否则会很大程度上影响 RNA 的得率和纯度。

- b 悬浮细胞：离心收集细胞，加入 **Buffer cRL1**(加入量见下表)，用移液器反复吹打混匀(直到看不到细胞团为止)。

注意：RNA 在 Buffer cRL1 中不会受到 RNase 的影响产生降解。如果细胞在加入 Buffer cRL1 裂解后不立即使用，在室温条件下可保存约 24 小时，在 4℃中保存约 1 周，更长时间保存请存放于 -80℃。使用时将溶液在室温或 37℃溶解即可。

表：细胞数量与试剂使用量关系列表

培养器皿	细胞数量	试剂添加量	
		Buffer cRL1	Buffer cRL2
96/48/24/12 孔板	<10 ⁶	250 μL	400 μL
6 孔板/3.5 cm 板	~10 ⁶	500 μL	800 μL
6 cm 及以上培养板	>5×10 ⁶	建议取不超过 5×10 ⁶ 细胞或分次进行提取	
细胞培养瓶			

2. 将裂解好的细胞混合液转移至 DNA-Cleaning Column 中(DNA-Cleaning Column 放入收集管中)，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 **1 min**。移除 DNA-Cleaning Column，保留收集管内上清液。

注意：如果 DNA-Cleaning Column 收集管底部有沉淀产生，请将上清液转移至新的离心管中再进行步骤 3，切勿将其吸入上清液中。

3. 向上述上清液中加入 **1.6 倍体积 Buffer cRL2**(加入量见上表；使用前请确认已按照说明加入无水乙醇)，轻柔混匀。

注意：Buffer cRL2 加入量请按照实际操作过程中上清液的体积进行比例换算加入。

4. 将所得混合液全部转移至 RNA-only Column 中(RNA-only Column 放入收集管中)，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 **10 sec**，弃掉收集管中的废液。

注意：若细胞数量为 6 孔板或 3.5 cm 板，请分两次将所得混合液全部过柱。如果混合液出现浑浊或絮状沉淀，请一并进行移液。

5. 向 RNA-only Column 中(RNA-only Column 放入收集管中)加入 **500 μL Buffer RW1**，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 **10 sec**，弃掉收集管中废液。

6. 向 RNA-only Column 中(RNA-only Column 放入收集管中)加入 **700 μL Buffer RW2**(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 **10 sec**，弃掉收集管中废液。

7. 重复步骤 6。

8. 将 RNA-only Column 放回收集管中，12,000 rpm (~13,400 ×g) 空管离心 **2 min**，弃掉收集管中废液，将 RNA-only Column 转移至新的 RNA 收集管中。

9. 向 RNA-only Column 的膜中央位置滴加 **20-50 μL** 已于 **65℃** 预热的 **RNase-Free ddH₂O**(切勿将洗脱液添加到压圈上，否则会损失较大体积的洗脱液)，室温放置 **2 min**。12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 **1 min** 收集 RNA 溶液。

注意：RNase-Free ddH₂O 加入体积不应低于 20 μL，体积过小会影响洗脱效率；增加洗脱体积可提高 RNA 产量，但相应浓度会有些许降低。

为提高 RNA 产量，可将离心得到的 RNA 溶液重新加至纯化柱中，重复步骤 9。

得到的 RNA 溶液可直接用于下游实验或置于 -80℃ 保存。

