
版本号:251025**Cytoplasmic & Nuclear RNA Purification Kit****细胞浆/细胞核RNA快速提取试剂盒**

目录号: RN64

❖ 适用范围:

适用于快速提取新鲜培养组织细胞的细胞浆/细胞核RNA。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	100 次(RN6401)
Buffer RLN	室温	20 ml
Buffer RLN (No NP40)	室温	20 ml
裂解液 RLT Plus	室温	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	70 ml
漂洗液 RW	室温	20 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	5 ml
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	100 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 不合适的储存于低温（4℃ 或者-20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃-25℃）进行。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍：

本试剂盒采用特制的裂解液，可以选择性的裂解细胞膜，释放细胞浆RNA，离心取上清便可以提取细胞浆RNA。去除上清以后的留下的细胞核沉淀可以提取细胞核RNA。从而达到分别提取细胞浆RNA和细胞核RNA的目的。

❖ 产品特点：

1. 完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 简捷，单个样品操作一般可在25分钟内完成，
3. 独家研发成功基因组DNA清除柱技术/特殊配方可以有效清除gDNA残留。和进口的同类对比，大大减少了细胞核RNA里面的gDNA残留量。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀典型的比值高达2.1~2.2，基本无DNA残留，可用于RT-PCR，Northern-blot和各种实验。

❖ 注意事项

1. 需要使用新鲜的细胞，组织样品。
2. 所有的离心步骤均可在室温完成，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机
3. 需要自备乙醇，研钵(可选)。
4. 裂解液RLT Plus 和去蛋白液RW1中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，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。
5. 本试剂盒可以提取100个细胞浆RNA样品，或者50个细胞核样品。因为提取一个细胞核RNA样品需要2套RNA吸附柱，因此如果需要同时提取50个细胞浆RNA样品+50个细胞核RNA样品，需要额外单独订购50套RNA吸附柱。
6. Buffer RLN 含有0.5% NP40，这是一种温和的非离子去垢剂，通过NP40来选择性裂解细胞膜（不裂解细胞核膜）来达到分开细胞浆/核RNA的目的，如有个别细胞膜特殊导致裂解过头，或者裂解不佳，导致细胞浆/核RNA分离不理想，我们配套提供了Buffer RLN(No NP40)，这个是未添加NP40的裂解液RLN，我们可以通过往里面添加梯度的NP40（例如添加

NP40到终浓度0.4%，0.5%，0.6%，0.7%，0.8%等等）配成一系列的裂解液RLN（含不同的NP40浓度），来摸索最佳的裂解条件，同时也可以调整裂解的时间，以期达到最佳分离效果。技术支持QQ：328153626。

❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶按照瓶子标签指示加入无水乙醇!
- ⇒ 可选：每次临用前在 Buffer RLN 中加入 1 mM DTT (optional)
- ⇒ 可选：每次临用前在 Buffer RLN 中加入 1000 U/ml RNase inhibitor

（一）、样品处理裂解

1. 培养细胞

A1. 贴壁细胞：培养皿生长的细胞（< 3.5cm 直径）不需胰酶消化，彻底吸干净培养液体后加 1 x PBS 漂洗一遍，彻底吸掉液体，接**操作步骤 3**；不方便直接裂解的培养容器，可以用细胞刮子刮下细胞，或者胰酶消化后吹打下来收集细胞到 1.5 ml 离心管。

A2. 悬浮细胞：收集< 10⁷ 悬浮细胞到一个 1.5 ml 离心管。

B. 300 × g 离心 5 min。完全吸弃上清，留下细胞团，注意不完全弃上清会稀释裂解液导致产量纯度降低。

C. 快速拨弹（Flick）离心管底部，使细胞沉淀松散，立刻接**操作步骤 3**。

2. 小量组织

A. 液氮研磨+匀浆：

可以直接切 10–15 mg 组织放入研钵，加入液氮磨成粉，然后趁液氮挥发完，但尚未解冻时候加入 175 μl Buffer RLN(事先插入冰中或者 4°C 预冷)，用剪大口径的移液器轻柔吹打直到组织裂解完全，转移裂解物到新的离心管。

B. 立刻接**操作步骤 4**。

3. 加入 175 μl Buffer RLN(事先插入冰中或者 4°C 预冷)裂解细胞。

如果是培养皿，加入 Buffer RLN 后摇晃将 Buffer RLN 覆盖所有的细胞，轻柔用橡皮刮子刮下细胞，转移到 1.5 ml 离心管，置冰上裂解 5 min。

如果是收集的细胞沉淀，Flick 管底充分打散沉淀后加 Buffer RLN 小心轻柔充分重悬细胞，置冰上裂解 5 min，中间可颠倒一两次帮助裂解。

4. 4°C , 300 × g 离心 2 min。转移上清（含细胞浆 RNA）到一个新离心管。保留沉淀（含细胞核 RNA）。在沉淀中加入 400 μl 裂解液 RLT Plus, 振荡混匀置冰上备用。

根据细胞的种类和多少，有时候可能看不见明显的细胞核沉淀。

（二）、细胞浆 RNA 提取（以下步骤均在室温进行）

1. 样品处理裂解第 4 步得到的上清中加入 600 μl 裂解液 RLT Plus, 涡旋震荡混匀。加入 430 μl 无水乙醇, 吹打混匀。
2. 立刻将混合物(每次小于 720 μl, 多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。
3. 加 700 μl 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 sec, 13, 000 rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。
4. 加入 500 μl 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 13, 000 rpm 离心 15 sec, 弃掉废液。加入 500 μl 漂洗液 RW, 重复一遍。
5. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13, 000 rpm 离心 2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
6. 取出吸附柱 RA, 放入一个干净 1.5 ml 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位悬空滴加 30-50 μl RNase free water, 室温放置 1 min, 13, 000 rpm 离心 1 min 得到 RNA 溶液。

洗脱缓冲液体积不应少于 30 μl, 体积过小影响回收效率。如果需要得到更大浓度的 RNA, 将离心得到的 RNA 溶液加回到吸附柱重复洗脱一遍。

（三）、细胞核 RNA 提取（以下步骤均在室温进行）

1. 样品处理裂解第 4 步得到的重悬后沉淀（已经加入了 400 μl 裂解液 RLT Plus）吹打混匀后加入一个 RNA 吸附柱 RA 上（吸附柱放入收集管中）。立刻 13, 000 rpm 离心 1 min, 保留滤过液（细胞核 RNA 在滤过液中）。
2. 在滤过液中加入一半体积（0.5 倍体积）乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, **立即吹打混匀**, 不要离心。
3. 立刻将混合物加入一个新的吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13, 000 rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。
4. 接操作步骤“（二）细胞浆 RNA 提取”步骤 3 开始做, 完成后续实验操作。