**动物组织总RNA提取试剂盒**

**（离心柱型）**

**货号：KTSM2905**

**■ 产品简介：**

本试剂盒采用针对动物的独特的裂解缓冲系统，可从动物组织中快速提取总RNA，配合高效的吸附纯化系统，可同时处理大量不同样品。提取的总RNA纯度高，无蛋白和DNA污染，可做RNA印迹分析、斑点杂交、体外翻译、cDNA合成等实验。

**■主要成分**：

|  |  |
| --- | --- |
| **产品组成** | **KTSM2905（50次）** |
| 裂解液RG | 30 ml |
| 去蛋白液RD | 16 ml |
| 漂洗液RW | 12 ml |
| RNase-Free-Water | 15 ml |
| DNase I | 1 ml |
| 10 × DNase Ibuffer | 500 µl |
| Proteinase K | 500 µl |
| RNase-Free吸附柱R1（含2 ml收集管） | 50个 |
| RNase-Free离心管（1.5 ml） | 50个 |

**■保存条件**：

DNase I，10 × DNase I Buffer，Proteinase K置于-20℃保存；其他溶液于室温（15-25℃）保存。

**■自备试剂**：

β-巯基乙醇、无水乙醇。

**■ 注意事项：**

（1）第一次使用前请先在去蛋白液RD和漂洗液RW瓶中加入指定量无水乙醇，并做好标记。

（2）裂解液RG在使用前请加入β-巯基乙醇至终浓度为1%，如1 ml裂解液RG加10 μl β-巯基乙醇。加入β-巯基乙醇的裂解液RG在4℃可保存1个月，如出现沉淀，请加热溶解后使用。DNase I-20℃保存应避免反复冻融。

（3）裂解液RG和去蛋白液RD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）以下操作如非指明，均在室温下进行。

**■ 预防RNase污染：**

（1）全程佩戴一次性手套，经常更换新手套。皮肤经常带有细菌和霉菌，可能污染RNA的抽提并成为RNA酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。

（2）使用无RNA酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在150°C的烘箱中烘烤4 h，塑料器皿可以在0.5 M NaOH中浸泡10 min，用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。

**■ 操作步骤：**

1. 匀浆处理：每10-20 mg动物组织加300 μl裂解液RG（**使用前请先检查是否已加入1% β-巯基乙醇**），使用匀浆器将组织彻底研磨；随后向匀浆液中加入590 μlRNase-Free Water 和 10 μlProteinaseK，混匀后56℃处理10-20 min。

**注意：组织量一定不要超过20 mg，否则将导致RNA得率和质量下降。**

1. 12,000 rpm离心2 min，取上清于新的RNase-Free 离心管中。
2. 缓慢加入0.5倍上清体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱R1中（吸附柱放在收集管中），12,000 rpm离心30 sec，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
3. 向吸附柱R1中加入350 μl去蛋白液RD（**使用前请先检查是否已加入乙醇**），12,000 rpm离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
4. DNase I工作液的配制：往新的RNase-Free 离心管中分别加入20 μlDNase I，8 μl 10 × DNase IBuffer 和52 μlRNase-Free Water，轻柔混匀。
5. 向吸附柱R1中央加入80 μl的DNase I工作液，室温放置15 min。
6. 向吸附柱R1中加入350 μl去蛋白液RD，12,000 rpm离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
7. 向吸附柱R1中加入500 μl漂洗液RW（**使用前请先检查是否已加入乙醇**），室温放置2 min，12,000rpm离心30 sec，倒掉废液，将吸附柱R1放回收集管中。
8. 重复步骤8。
9. 12,000 rpm离心2 min，倒掉废液。将吸附柱R1置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意：此步骤目的是将吸附柱R1中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的RT等实验。**

1. 将吸附柱R1转入一个新的RNase-Free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100 μl RNase-Free Water，室温放置2 min，12,000 rpm离心2 min，得到RNA溶液。

**注意：洗脱缓冲液体积不应少于30 μl，体积过小影响回收效率。RNA溶液请在-70**℃**保存。**