

Kit Contents

RNeasy Fibrous Tissue Kit	Mini (50)	Midi (10)
Catalog no.	74704	75742
Number of preps	50	10
RNeasy Mini Spin Columns (each in a 2 ml Collection Tube)	50	–
RNeasy Midi Spin Columns (each in a 15 ml Collection Tube)	–	10
Collection Tubes (1.5 ml)	50	–
Collection Tubes (2 ml)	50	–
Collection Tubes (15 ml)	–	10
Proteinase K	1.4 ml	1.4 ml
Buffer RLT*	45 ml	45 ml
Buffer RW1 *	45 ml	45 ml
Buffer RPE [†] (concentrate)	11 ml	11 ml
RNase-Free Water	4 x 10 ml	5 x 10 ml
RNase-Free DNase Set:		
■ RNase-Free DNase I (lyophilized)	1500 units	1500 units
■ Buffer RDD	2 x 2 ml	2 x 2 ml
■ RNase-Free Water	1.5 ml	1.5 ml
Handbook	1	1

运输与储存

RNeasy Fibrous Tissue Kits 室温运输。RNase-Free DNase Set 套装，包括 RNase-free DNase, Buffer RDD, 以及 RNase-free water，收到后应立即置于 2–8°C。试剂盒其余组分可以在室温下储存。所有成分在相应条件下储存可以稳定 9 个月以上。

即用型 proteinase K 是在特殊的保存液中溶解的，室温可以稳定 1 年。如果需要延长 proteinase K 的保存时间，我们建议将其保存在 2–8°C。

客户需要自己准备的仪器和试剂

操作化学试剂时，需要穿戴合适的实验服，一次性手套及防护眼镜。更多信息请参考试剂生产厂家的安全数据。

- 14.3 M β -巯基乙醇(β -ME) 或者二硫苏糖醇 (DTT)
- 无水乙醇(96–100%)*
- 灭菌除 RNA 酶的枪头
- 一次性手套
- 可以达到 55°C 的水浴锅或加热模块
- 用于组织破碎和均质化的仪器(见第 12 页):我们建议使用 TissueRuptor 或者 TissueLyser system (见第 36 页的订购信息)
- 用于稳定组织中的 RNA(见第 12 页): RNAlater® RNA Stabilization Reagent (见第 36 页的订购信息) 或者液氮和干冰
- 1.5 ml or 2 ml 离心管
- 离心机 (可以放置 2 ml 的离心管)

操作步骤：使用 RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit 纯化总 RNA

确定合适的起始材料量

为了获得最佳的 RNA 产量和纯度，有必要确定合适的组织量。使用 RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit 通常最大可以处理 30 mg 组织。对大多数组织来说，这个起始量不会超过 RNeasy spin column 的 RNA 结合能力，Buffer RLT 以及 proteinase K 的裂解能力。不同类型组织的平均 RNA 产量已经在表 2 (第 12 页) 中给出了。

如果没有起始材料的相关信息，我们建议其实组织样品量不应超过 10 mg。在后续的制备过程中是否可以用到 30mg 组织取决于组织样品中 RNA 的产量。

RNeasy spin column 不应超载，否则会明显降低 RNA 产量及纯度。

称量组织是最准确的方法来确定起始材料量。

例如：3 mm 立方 (27 mm³)的组织约重 25–35 mg。

注意事项：

- 如果第一次使用 RNeasy Fibrous Tissue Kits，请阅读第 11 页“Important Notes”
- 如果第一次操作 RNA，请阅读第 30 页“Appendix A”
- 如果使用 TissueRuptor，请熟悉 TissueRuptor User Manual 和 TissueRuptor Handbook 的操作
- 如果使用 TissueLyser，请熟悉 TissueLyser Handbook 的操作
- 由于 RNase 灭活的 Buffer RLT 必须稀释以便 proteinase K 进行消化，此操作步骤不应用于富含 RNases 的组织，例如胰腺或小肠组织。
- 可以使用新鲜、冷冻、或者 RNAlater 稳定的组织。如果是冷冻组织，应先在液氮中速冻再转移至 -70°C ，这样可以保存数月。组织在用 Buffer RLT 破碎之前的称量或者处理时不应溶解。第 4 步的均质化裂解液也同样可以置于 -70°C 数月。第 5 步进行之前，用 37°C 水浴孵育可以完全溶解组织和盐类。避免孵育时间过长，否则会影响 RNA 的完整性。
- 不应涡旋重悬的 DNase I。DNase I 对于物理变性非常敏感，因此只需要在管中轻轻倒转即可混匀。
- Buffer RLT 在储存过程中可能会形成沉淀，如果有必要，可以加热溶解再置于室温 ($15-25^{\circ}\text{C}$)。
- Buffer RLT 和 Buffer RW1 包含离液盐，因此不能和含有漂白剂的消毒液兼容。见第 6 页的安全信息。
- 除非特别要求，所有的步骤都应在室温下快速进行。
- 所有的离心步骤均在 $20-25^{\circ}\text{C}$ 下进行，保证离心机的温度不低于 20°C 。

准备工作：

- 使用之前保证将 β -巯基乙醇(β -ME)加入至 Buffer RLT 中。每 1 ml Buffer RLT 加入 $10\ \mu\text{l}$ β -ME。穿戴防护服在通风橱中分装。含有 β -ME 的 Buffer RLT 可以在室温下储存 1 个月。
- 替代方法：每 1 ml Buffer RLT 中加入 $20\ \mu\text{l}$ ，2 M dithiothreitol (DTT)。2 M DTT 的水溶液需要新鲜配置，或者分装冻存。含有 DTT 的 Buffer RLT 可以在室温下储

存 1 个月。Buffer RPE 是以浓缩液的形式提供的，在第一次使用之前需要按照瓶子上的至少加入 4 体积的无水乙醇 (96–100%) 制备工作液。

- 在第一次使用 RNase-Free DNase Set 之前需要准备 DNase I 储存液。用 550 μ l RNasefree water 溶解 DNase I (1500 Kunitz 单位) 冻干粉 (RNase-Free DNase Set 中提供)。为避免 DNase I 损失，不要打开药瓶，直接将 RNase-free water 用除 RNA 酶的注射器和针头直接注射入药瓶。翻转药瓶轻轻混匀，不要涡旋。如果需要长期储存 DNase I，将储存液从玻璃药瓶中分装，置于 -20°C 可以保存 9 个月。溶解后的储存液可以在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 放置 6 weeks。不要反复冻融。

操作步骤

1. 将水浴锅或加热模块加热至 55°C 用于第 6 步 proteinase K 消化。
2. 如果使用 TissueLyser, 每个 2 ml 离心管 (自备) 中加入 1 个钢珠(5 mm 平均直径)。如果操作没有经过 RNAlater RNA Stabilization Reagent 稳定的组织，将管子置于干冰上。
3. 从动物/存储样品中剪切合适大小的组织，确定组织量不要超过 30mg。立即进入第 4 步。

称量时确定起始组织量最准确的方法。

如果组织储存在 RNAlater RNA Stabilization Reagent 中，将组织用镊子从中取出，确保去除可能形成的任何晶体。

组织中的 RNA 只有在用 RNAlater RNA Stabilization Reagent、速冻、或者第 4 步破碎和均质化之后才会被保护。

处理过程中速冻的组织不能溶解，相关操作需要迅速进行。

4. 使用 TissueRupter (第 4a) 或者 TissueLyser (第 4b) 破碎和均质化裂解物。

见第 12 页“Disrupting and homogenizing starting material。”

注意：使用前确保已经将 β -ME 加入到 Buffer RLT 中。(见“Things to do before starting”)。

注意：均质化不完全将导致 RNA 的产量明显降低，也会堵塞 RNeasy spin column。使用 TissueRuptor 或者 TissueLyser 通常会比其他方法得到更高的 RNA 产量。

4a. 使用 TissueRuptor 进行破碎和均质化:

- 将组织置于合适大小的容器中，加入 300 μ l Buffer RLT.通常圆底的管子比锥形底的管子破碎效率更高。
- 将一次性探头放入容器，全速开启 TissueRuptor 直到裂解物完全均质化(通常约 20–40 s)。进入第 5 步。
- 注意：为避免操作过程中 TissueRuptor 和一次性探头损伤，需确保探头一直淹没在 Buffer 中。

4b. 使用 TissueLyser: 进行破碎和均质化:

- 将组织至于第 2 步准备好的管子中。
- 如果管子置于干冰上，取出置于室温，每管中立即加入 300 μ l Buffer RLT。
- 将管子置于 TissueLyser Adapter Set 2 x 24.
- 开启 TissueLyser，2 min，20 Hz。
- 操作时间取决于需要处理的组织，直至组织完全均质化。
- 重置管子的排布，将最外层的置于最内层，最内层的置于最外层。开启 TissueLyser，2 min，20 Hz。
- 重置管子的排布，直至样品完全均质化。

5. 向裂解液中加入 590 μ l RNase-free water，后加入 10 μ l proteinase K 溶液，用枪吹匀。

6. 55°C 孵育 10 min。

7. 10,000 x g，20–25°C 离心 3 min。

上清液中常会形成一层小的组织碎片。

8. 将上清液(约 900 μ l)转移至一个新的 1.5 ml 或 2 ml 离心管中 (自 卑)。

避免转移任何组织团块。如果不能避免，少量的组织碎片不会影响 RNeasy 的操作过程。保持枪头在上清液的薄层以下。这一层通常会黏附在枪头外壁，不能被转移。

9. 将 0.5 倍体积(约 450 μ l)的无水乙醇(96–100%)加入到澄清的裂解液中，不要离心。加入乙醇后可能会看见沉淀，但并不会影响后续操作。

10. 将 700 μ l 样品，包括可能形成的沉淀加入到置于 2ml 收集管中的 RNeasy Mini spin column 中，盖上管盖，8000 x g (10,000 rpm)，20–25°C 离心 15 s。弃流出液。第 11 步可重复使用收集管。

11. 用剩下的样品重复第 10 步，弃流出液。第 12 步可重复使用收集管。

12. 将 350 μ l Buffer RW1 加入到 RNeasy spin column，盖上管盖，8000 x g (10,000 rpm)，20–25°C 离心 15 s 洗膜，弃流出液。第 15 步可重复使用收集管。

可选：如果进行不需要进行柱上 DNase I 消化，可直接加入 700 μ l Buffer RW1，8000 x g (10,000 rpm)，20–25°C 离心 15 s，弃流出液（不要弃收集管），直接进入第 16 步。

13. 将 10 μ l DNase I 储存液加入到 70 μ l Buffer RDD 中，翻转管子混匀，短离收集管壁上的残液。

注意：DNase I 对物理破坏非常敏感，翻转管子使需要轻柔，不要涡旋。

14. 将 DNase I 孵育液(80 μ l)直接加入到 RNeasy spin column 膜上，置于试验台上 (20–30°C) 15 min。

注意：确保将 DNase I 孵育液直接覆盖 RNeasy spin column 膜上。如果一部分孵育液堵在壁上或者 O 型圈上，则将导致 DNase 消化不完全。

15. 将 350 μ l Buffer RW1 加入到 RNeasy spin column 中。盖上管盖，8000 x g (10,000 rpm)，20–25°C 离心 15 s 洗膜，弃流出液。第 16 步可重复使用收集管。

16. 将 500 μ l Buffer RPE 加入到 RNeasy spin column 中，盖上管盖，8000 x g (10,000 rpm)，20–25°C 离心 15 s 洗膜，弃流出液。第 17 步可重复使用收集管。

注意：Buffer RPE 是以浓缩液的形式提供的，保证在使用之前已经加入了乙醇。（见“Things to do before starting”）。

17. 将 500 μ l Buffer RPE 加入到 RNeasy spin column 中，盖上管盖，8000 x g (10,000 rpm)，20–25°C 离心 2min。

离心时间长可以使 spin column 膜干燥，保证在 RNA 洗脱液中没有乙醇残留。残留的乙醇会干扰下游反应。

注意：离心之后，小心将 RNeasy spin column 从收集管中取出，柱子不要接触到流出液，否则会沾带上乙醇。

18. 可选：将 RNeasy spin column 至于一个新的 2 ml 收集管中（提供），弃含有流出液的旧离心管，盖上管盖，全速离心 1 min。

这一步可以去除可能沾带上的 Buffer RPE，或者第 17 步后残留在 RNeasy spin column 外的流出液。

19. 将 RNeasy spin column 置于一个新的 1.5 ml 收集管中（提供），直接加入 30–50 μ l RNase-free water 到 RNeasy spin column 膜中，盖上管盖，8000 x g (10,000 rpm)，20–25°C 离心 1min 洗脱 RNA。

20. 另用 30–50 μ l RNase-free water 或者用第 19 步的洗脱液（如果需要得到高浓度的 RNA）重复第 19 步。重复使用第 19 步的收集管。如果期望 RNA 产量 >30 μ g，不需要重复第 19 步。如果使用第 19 步的洗脱液，RNA 产量会比再次使用 RNase-free water 的产量低 15–30%，但 RNA 的终浓度会比较高。