

总 RNA 提取 II 型试剂盒

E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit II

货号	R6934-00	R6934-01	R6934-02
反应次数	5 次	50 次	200 次
HiBind [®] RNA Mini Columns	5 个	50 个	200 个
2 mL Collection Tubes	10 个	100 个	400 个
RNA-Solv [®] Reagent	5 mL	60 mL	220 mL
RNA Wash Buffer I	5 mL	50 mL	200 mL
RNA Wash Buffer II	5 mL	12 mL	50 mL
Nuclease-free Water	5 mL	10 mL	40 mL
User Manual	✓	✓	✓

★ 保存方式及稳定性

- 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输。RNA-Solv[®] Reagent 长期保存需要放置 2-8°C。
- 当贮存温度较低时，有些组分易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37°C 中，至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用；
- 本试剂盒仅限科学研究使用。

★ 实验前准备

- 按照下表提示，使用【无水乙醇】对 RNA Wash Buffer II 进行稀释，稀释后室温保存；

货号	无水乙醇 加入量
R6934-00	20 mL
R6934-01	48 mL
R6934-02	200 mL

- （可选）每毫升 RNA-Solv[®] Reagent 需加入 20 μ L 2-巯基乙醇，该混合液可室温贮存两周。

★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 离心转速可达 12,000xg 的小型低温离心机
- ✓ 无 RNase 的吸头及 1.5mL 离心管
- ✓ 氯仿、无水乙醇、70%乙醇（由无酶水配置）
- ✓ 匀浆工具（如针管针头、研磨棒、玻璃珠、自动匀浆仪）
- ✓ （可选）14.3M 2-巯基乙醇、真空抽滤装置、DNase I 消化套装

★ 提取步骤 —— 细胞样品

1. 使用正确数量的培养细胞对获得最佳提取效果至关重要。HiBind® RNA Mini Columns 的最大结合能力为 100µg。RNA-Solv® Reagent 可有效裂解的最大细胞数为 1×10^7 。如首次进行实验，我们建议从 1×10^6 个细胞开始尝试提取，如获得理想产量后，可在下一次提取中适当增加样品量。

2. 按照如下方法收集不超过 1×10^7 数量的细胞：

✓ 悬浮培养细胞：

1. 500xg 离心 5min 收集细胞，弃去上清培养液；
2. 接第 3 页第 3 步继续操作。

✓ 贴壁培养细胞：

注意：贴壁培养可以选择在培养皿中直接裂解，也可选择用胰蛋白酶消化后作细胞沉淀收集。在培养瓶中生长的细胞，我们建议使用胰蛋白酶进行消化。

1) 直接裂解操作办法：

1. 弃除培养基；
2. 接第 3 页第 3 步继续操作。

2) 胰蛋白酶消化及细胞收集操作办法：

1. 弃除培养基并使用 PBS 溶液对细胞进行洗涤；若培养基清洗不彻底，可能会抑制胰蛋白酶活性；
2. 盐溶液中加入 0.1-0.25%的胰蛋白酶，室温孵育 3-5 分钟让细胞分散；
3. 加入等体积含有血清的细胞培养基使胰蛋白酶失活，转移到无酶的离心管内；

4. 室温，500xg 离心 5min，去除上清培养基
5. 接第 3 页第 3 步继续操作。
3. 参考以下细胞量加入 RNA-Solv[®] Reagent，涡旋或上下吸打彻底混匀；每 1mL RNA-Solv[®] Reagent 需要加入 20 μL 2-巯基乙醇。

细胞数量	RNA-Solv [®] Reagent 加入体积
< 5x10 ⁶	500 μL
5x10 ⁶ -1x10 ⁷	1000 μL

4. 参考原文说明书第 7 页其中一种方法对样品进行裂解以及匀浆。室温静置 5min。
5. 加 100 μL (< 5x10⁶ 细胞) 或 200 μL (> 5x10⁶ 细胞) 氯仿，高速涡旋 20s 充分混匀。室温静置 2-3min。
6. 4°C 最大速度(> 12,000xg)离心 15min 分离水相以及有机相，转移上层水相 (约 250 μL 或 500 μL) 到一新的 1.5 mL 离心管中。
注意：转移上清时，注意由上往下吸取大约 80% 的上清液量。
7. 加入与上清等体积的 70%乙醇，涡旋彻底混匀，请勿进行离心或瞬时离心。
8. 将 HiBind[®] RNA Mini Columns 套入收集管中，转移第 7 步得到的混合液到结合柱中 (每次转移的混合液 ≤ 700μL)，室温 10,000xg 离心 1min，弃滤液。
9. 重复步骤 8，直至所有混合液都结合到 HiBind[®] RNA Mini Columns 上。

可选 DNase I 消化步骤 (需另购 DNase I Set 货号 E1091)

如需使用 DNase I 对 DNA 污染进行消解，请参考第 6 页“DNase I 消化步骤”。如无需进行 DNA 消解，请接着按第 10 步操作；

10. 将 HiBind[®] RNA Mini Columns 套入收集管中，加入 500μL RNA Wash Buffer I 至结合柱中，10,000xg 离心 30s，弃滤液。
11. 将 HiBind[®] RNA Mini Columns 套回收集管中，加入 500μL RNA Wash Buffer II (已加无水乙醇正确稀释) 至结合柱中，10,000xg 离心 1min，弃滤液。

注意：RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

12. 重复步骤 11 进行第二次 RNA Wash Buffer II 洗涤。
13. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套回收集管中，10,000xg 离心空甩 2min。
14. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 45-75 μ L Nuclease-free Water 至结合柱中，10,000xg 离心 2min 洗脱 RNA，产物放置 -70°C 保存。

注意：以下操作可能帮助提高 RNA 产量：

- 使用前将 Nuclease-free Water 70°C 预热；
- 室温静置 5min；
- 增加洗脱液的体积；
- 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）
- 将第一次洗脱出的 Nuclease-free Water 重新加回到柱子中进行二次洗脱（可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积）

★ 提取步骤 —— 动物组织样品

1. 使用正确组织起始量对获得最佳提取效果至关重要。HiBind® RNA Mini Columns 的最大结合能力为 100 μ g。RNA-Solv® Reagent 可有效裂解的最大组织量为 30mg。如首次进行实验，我们建议从 10mg 样品量开始尝试提取，如获得理想产量后，可在下一次提取中适当增加样品量。
2. 参考原文说明书第 7 页其中一种方法对组织样品进行裂解以及匀浆，组织量不要超过 30mg。每 1mL RNA-Solv® Reagent 需要加入 20 μ L 2-巯基乙醇。
3. 室温静置 5min。
4. 加入 200 μ L 氯仿，高速涡旋 20s 充分混匀。室温静置 2-3min。
5. 4°C 最大速度 (>12,000xg) 离心 15min 分离水相以及有机相；转移上层水相（约 500 μ L）到一新的 1.5 mL 离心管中。
6. 加入与上清等体积的 70%乙醇，涡旋彻底混匀，请勿进行离心或瞬时离心；

7. 将 HiBind[®] RNA Mini Columns 套入收集管中，转移第 6 步得到的混合液到结合柱中（每次转移的混合液 \leq 700 μ L），室温 10,000xg 离心 1min，弃滤液；
8. 重复步骤 7，直至所有混合液都结合到 HiBind[®] RNA Mini Columns 上；

可选 DNase I 消化步骤（需另购 DNase I 消化套装 #E1091）

如需使用 DNase I 对 DNA 污染进行消解，请参考第 6 页“DNase I 消化步骤”。如无需进行 DNA 消解，请接着按第 9 步操作；

9. 将 HiBind[®] RNA Mini Columns 套入收集管中，加入 500 μ L RNA Wash Buffer I 至结合柱中，10,000xg 离心 30s，弃滤液；
10. 将 HiBind[®] RNA Mini Columns 套回收集管中，加入 500 μ L RNA Wash Buffer II（已加无水乙醇正确稀释）至结合柱中，10,000xg 离心 1min，弃滤液；

注意：RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

11. 重复步骤 10 进行第二次 RNA Wash Buffer II 洗涤；
12. 将 HiBind[®] RNA Mini Columns 套回收集管中，10,000xg 离心空甩 2min。
13. 将 HiBind RNA Mini Columns 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 45-75 μ L Nuclease-free Water 至结合柱中，10,000xg 离心 2min 洗脱 RNA，产物放置-70 $^{\circ}$ C 保存。

注意：以下操作可能帮助提高 RNA 产量：

- 使用前将 Nuclease-free Water 70 $^{\circ}$ C 预热；
- 室温静置 5min；
- 增加洗脱液的体积；
- 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）

★ DNase I 消化步骤 (可选步骤)

用户自备试剂：DNase I Digestion Set (货号 E1091)

按照上述《细胞样品提取步骤》完成 1-9 步或《动物组织提取步骤》完成 1-8 步后，请按以下步骤操作：

1. 每一个 HiBind® RNA Mini 结合柱，按照按下表配置 DNase I 溶液：

溶液名称	每份配量
Digestion Buffer	73.5μL
RNase-Free DNase I	1.5μL
总量	75μL

重要提示：

- ✓ DNase I 非常敏感且易发生物理变性，切勿大力涡旋 DNase I 溶液。建议轻柔颠倒离心管进行混匀；
 - ✓ DNase I 混合液需现配现用；
 - ✓ 请使用套装内配套的 Digestion Buffer 消化液，其他消化液与膜上消化操作不配套，可能会降低 RNA 产量及纯度；
 - ✓ 全部操作均在室温下进行，请谨慎且尽量快速地操作。
2. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套入 2ml 收集管中，往 HiBind® RNA Mini Columns 加入 250μL RNA Wash Buffer I，10,000×g 室温离心 1min，弃掉滤液；
 3. 将配置好的 75μL 的 DNase I 溶液，转移至 HiBind® RNA Mini Columns 膜的正中央，切勿打到结合柱壁；
 4. 室温静置 15min；
 5. 加入 250μL RNA Wash Buffer I 至 HiBind® RNA Mini Columns 中，室温静置 2min，10,000xg 离心 1min，弃滤液；
 6. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套回收集管中，加入 500μL RNA Wash Buffer II (已加无水乙醇正确稀释) 至结合柱中，10,000xg 离心 1min，弃滤液；

注意：RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

7. 重复步骤 6 进行第二次 RNA Wash Buffer II 洗涤；
8. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套回收集管中，10,000xg 离心空甩 2min。
9. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 45-75 μ L Nuclease-free Water 至结合柱中，10,000xg 离心 2min 洗脱 RNA，产物放置 -70°C 保存。

注意：以下操作可能帮助提高 RNA 产量：

- 使用前将 Nuclease-free Water 70°C 预热；
- 室温静置 5min；
- 增加洗脱液的体积；
- 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）。

★ 产品信息卡



更多详情，请扫描左方二维码获取原文说明书
中文翻译仅供辅助阅读



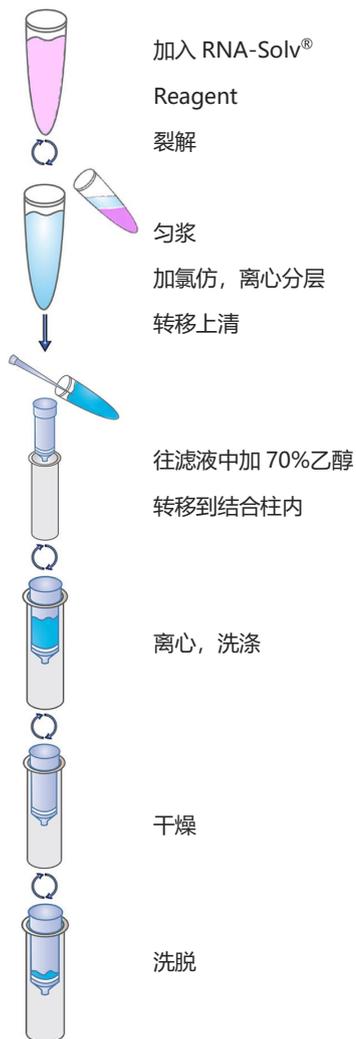
常见问题合集及操作注意事项
请扫描左方二维码获取



中国总代理：广州飞扬生物工程有限公司
技术支持：020-32051125
企业 QQ：800848200（人工客服在线）
中文网站：omegabiotek.com.cn
如需查询代理商名录，请关注“飞扬生物”微信号获取

★ 提取步骤示意图

离心操作流程



真空抽滤操作流程

