GENEPURE

總量 RNA 抽取試劑 (RareRNA 200ml)

產品編號:GPR02

產品介紹：

RareRNA 是一種可用於抽取動植物組織、細胞、細菌、酵母菌、真菌、甚至血清、尿液、体液等樣品中的 RNA 製品。

樣品在進行勻漿的過程中，RareRNA 能夠充分破壞細胞，裂解細胞內容物，同時可高效抑制 RNA 酶的活性，從而保持 RNA 的完整性。該試劑可用於小量樣品(10~100mg 組織，$1x10^4$ 細胞)也適用於大量樣品(>1g 組織，$>10^7$ 細胞)；可同時處理大量不同樣品，整個操作過程在 10 分鐘內即可完成。

本套組包含：

1.RareRNA reagent：200 ml

2.10× RBC lysis Buffer：500ml (使用前請稀釋成 1X)。(選購)

3.GP Reagent(可取代氯仿使用):200ml(選購)

4.GPR02-B01--RNA Binding Buffer :60ml (選購)

5.GPR02-B02--miRNA Elution Buffer :20ml (選購)

6.GPR02-B03--RNA Elution Buffer :20ml (選購)

保　存：本產品室溫下可保存半年以上，4℃下二年。

方法步驟：

在抽取 RNA 的過程中，其實有一個非常重要的關鍵，那就是樣品本身的新鮮狀況一般而言樣品愈新鮮，相對地 RNA 的完整性也就愈高。根據處理樣品的差異可區為：1.全血(2ml)。2.較難 Lysis 的如動植物的組織、酵母菌、真菌。3.培養細胞，細菌。4.血清、尿液、体液、小量全血(1~300ul)，因此步驟便有些許差異。

一、溶裂細胞

1.全血 RNA 的抽取：首先將抽取到的全血(請務必要加抗凝劑,不能凝固)以 2ml 的全血,加入 6ml 1 倍的 RBC lysis Buffer,混合均勻，放在冰上 5~10 分鐘後，以 450×g(約 3000rpm)離心 10 分鐘，儘量去除上液，留下底部的白血球細胞。再加入 RareRNA(1ml)來溶裂細胞。

2.較難 lysis 的動植物組織、酵母菌、真菌。建議用液態氮研磨或用組織均質機將細胞打破，取約 10~100mg 的組織量，以 1ml RareRNA 來溶裂細胞。

3.培養細胞 RNA 的抽取：首先將 petri dish 中的培養液去除乾淨後,以 1ml 的 RareRNA reagent 加入一盤 3.5cm 的 petri dish 的比例，直接溶裂細胞。如果細胞、細菌是懸浮狀，則將其離心收集，去除培養液後,以 1ml 的 RareRNA reagent 溶裂細胞(1ml/5~10 $\times 10^6$)。革蘭氏陽性菌請先用 Lysozyme 處理。

4.屬於体液方面的樣品 RNA 抽取：体液(200ul)需加入 1ml 的 RareRNA reagent 來溶裂細胞。

二、RNA 的抽取純化：【全程在室溫下操作即可】

1.溶裂均質後的樣品(1ml)請放置室溫中 1~2 分鐘。

2.加入 chloroform(0.3ml)或 GP Reagent (0.3ml)，劇烈混合後，離心(12000rpm) 3 分鐘。

3.小心取出上清液到新的離心管中，再加入 1 倍量的異丙醇,混合均勻，離心(12000rpm)3 分鐘後，將上清液儘量去除乾淨，留下沉澱物。

4.加入 70%的酒精(1ml)清洗管壁，spin down，將上清液儘量去除乾淨,留下沉澱物。

5 加入 50ul~200ul 的 H_2O 浸泡 2 分鐘後，再以 tip 反覆抽吸即可完全溶解核酸。

(建議用 RNA 長期保存液或RNAsafe 溶解 RNA)

這個作法簡單、快速，是目前大部份人所採用的方法，但是在實務操作上,很難保證樣品中的雜質是否已被完全清除乾淨，因此常會有 RNA 保存上的困擾。所以我們提供以下作法，可以進一步純化 RNA，並可分離 microRNA。

1.溶裂均質後的樣品(1ml)請放置室溫中 1~2 分鐘。

2.加入 chloroform(0.3ml) GP Reagent (0.3ml)，劇烈混合，再以最高轉速離心 3 分鐘。

3.小心取出上清液到新的離心管中，再加入 600ul 的 RNA Binding Buffer 劇烈混勻後靜置 2 分鐘進行 RNA Binding。

4.隨後，瞬間離心(按住 spin 鍵約 3~5 秒，千萬不要離太久)，將上清液清除乾淨。(如要分離 microRNA 請接續步驟 5a)。

5.加入 200ul 的 RNA Elution Buffer，將 resin 徹底打散，並置於 55℃的乾浴器中 5 分鐘。

6.以最高轉速離心 1 分鐘(一定要離心 1 分鐘以上)，取出上清液於新的離心管中，再加入 400ul 的酒精，劇烈混勻後，以最高轉速離心 1 分鐘，便會有 RNA 的沉澱物。

7.將酒精溶液清除後，便可以加入 300ul 的 H_2O 或 RNAsafe 浸泡 2 分鐘後，再以 tip 反覆抽吸即可完全溶解核酸。

★microRNA 的分離：

5a.如果您的實驗需要分離 microRNA 時，則加入 200ul 的 miRNA Elution Buffer，將 resin 徹底打散，並靜置 3 分鐘後，以最高轉速離心 10 秒鐘，此時上清液中便含有 microRNA。取出後，再加入 400ul 的酒精，劇烈震盪混勻後，以最高轉速離心 1 分鐘，便可得到 microRNA 的沉澱物，上清液去除乾淨後，便可以加入 200ul 的 H_2O 或 RNAsafe 浸泡 2 分鐘後，再以 tip 反覆抽吸即可完全溶解核酸。

6a.餘下的 resin 則含有較大分子的 RNA，再加入 200ul 的 RNA Elution Buffer，將 resin 徹底打散，並置於 60℃乾浴器中 5 分鐘，之後，以最高轉速離心 10 秒鐘，此時上清液中便含有大分子 RNA。取出後，再加入 400ul 的酒精劇烈震盪混勻後，以最高轉速離心 1 分鐘，便可得到大分子 RNA 的沉澱物；上清液去除乾淨後，便可以加入 300ul 的 H_2O 或 RNAsafe 浸泡 2 分鐘後，再以 tip 反覆抽吸即可完全溶解核酸。

註　解：

1.在整体操作過程中，對於器皿的要求並無特別規範，因為 RareRNA reagent 就含有很強的 RNase 抑制劑。

2.RNA 品質的好壞可以分成。(A) RNA 的完整性好不好，換句話說就是 RNA 有沒有被分解掉，這是非常重要的。在 RareRNA reagent 存在的狀況下，RNA 沒有被分解的疑慮，但是在樣品的取得或保存卻存在著很大的風險，一般將 RNA 保存於 DEPC 的水中，其實是一個非常危險的方式，尤其是不能長久保存。建議將 RNA 保存在 RNA 長期保存液，將可長久保存。(B)至於 RNA 純度夠不夠則視所加入純化的樣品量而定，樣品量愈大，純度自然會降低。(C)產量夠不夠，以 RareRNA reagent 而言是目前 RNA 產量最高的。歡迎與其他同類型的產品比較，即使是很微量的 RNA 病毒，RareRNA 也能回收，其回收率約 90%。(D)DNA 有無殘留,雖然無直接證據證明一定沒有 DNA 殘留,不過經由 RareRNA reagent 純化後的 Plasmid，再以 PCR 方式來偵測,並沒有偵測到 Plasmid DNA 的存在。

3.溶於 RNA 長期保存液中，可以讓 RNA 室溫保存一週或-20℃至少保存 1 年而免於降解。

4.最大樣品容許量：1ml RareRNA reagent/10^7cultured cells；100mg tissues；1×10^9 gram negative becteria。產量約 10^7 cultured cells=150-200ug；100mg tissue =200-300 ug。