

Uso exclusivo para pesquisa.

Kit de Extração de RNA Total

Catálogo	Especificação	Armazenamento/Validade
CV-R014-50	50T	Temperatura ambiente/ 1 ano
CV-R014-200	200T	Temperatura ambiente/ 1 ano

Introdução

Os reagentes usados neste kit não contêm fenol e clorofórmio, o que reduz significativamente o risco desses compostos para o experimentador e amplia o ambiente de uso. Este produto pode extrair rapidamente RNA total de células e tecidos animais, processando simultaneamente um grande número de amostras diferentes. O RNA total extraído apresenta alta pureza e contaminação extremamente baixa de proteínas e outras impurezas, podendo ser utilizado em RT-PCR, Real Time RT-PCR, análise de chip, Northern Blot, Dot Blot, triagem de PolyA, tradução in vitro, análise de proteção contra RNase e clonagem molecular, além de diversos outros experimentos downstream.

Componentes do Kit

Componente	CV-R014-50	CV-R014-200	Armazenamento
Lisado REL	15 ml	60 ml	TA
Tampão de Desproteção de RNA RRPB	70 ml	140 ml*2	TA
Tampão de Lavagem RWB	60 ml	240 ml	TA
Proteinase K	525 µl	2.1 ml	-20°C
Solução estoque de DNase I	525 µl	2.1 ml	-20°C
Tampão de DNase I RDB	5 ml	20 ml	TA
Coluna de Adsorção R	50 conjuntos	200 conjuntos	TA
ddH2O Livre de RNase	40 ml	160 ml	TA
Manual do Usuário	1 cópia	1 cópia	TA

Uso exclusivo para pesquisa.

I. Preparação antes do uso

RWB: Adicione etanol absoluto ao RWB (indicado no rótulo da garrafa de reagente) antes do uso.

Passos Operacionais

1. Processamento da amostra:

- Para amostras de células aderentes:
 - Aspire cuidadosamente o meio com uma pipeta, adicione 300 µL de Tampão de Lisado de Extração de RNA, pipete o lisado para cima e para baixo várias vezes com um raspador de células ou pipeta, e transfira a mistura para um tubo EP de 1,5 mL;
 - Para amostras de células suspensas:
 - Centrifugue a 300 ×g por 5 minutos a 4 °C para coletar o pellet celular em um tubo EP de 1,5 mL, descarte o sobrenadante, adicione 300 µL de lisado e misture repetidamente por pipetagem;
 - Para amostras de tecidos animais e vegetais:
 - Pegue 20 mg de tecido em 300 µL de lisado REL e moa completamente (use homogeneizador de vidro ou homogeneizador elétrico, fornecidos pelo usuário), transfira cuidadosamente a solução mista para um tubo EP de 1,5 mL (quantidade excessiva de tecido afeta a eficiência do lisado, a proporção de lisado pode ser aumentada proporcionalmente);
2. Adicione 590 µL de ddH₂O Livre de RNase e 10 µL de Proteinase K à amostra homogeneizada, misture completamente com agitação e banhe em 56 °C por 10 minutos.
 3. Centrifugue a 12.000 rpm (~13.400×g) por 5 minutos. Transfira o sobrenadante para um novo tubo EP de 1,5 mL e proceda com as operações seguintes.
 4. Adicione lentamente 0,5 vezes o volume de etanol ao sobrenadante (preparado pelo usuário), misture invertendo (não agite vigorosamente, a precipitação pode ocorrer neste momento), e transfira a solução obtida e a precipitação para a coluna R (adsorção A coluna foi colocada em um tubo de coleta), centrifugada a 10.000 rpm (~10.000 × g) por 1 minuto, descarte o líquido residual no tubo de coleta e devolva a coluna de adsorção R ao tubo de coleta. (A coluna de adsorção pode ser preenchida com 750 µL de solução de uma só vez. Se a solução e a precipitação não puderem ser adicionadas de uma vez, transfira para a coluna R da coluna de adsorção várias vezes).

Instruções Operacionais

5. Adicione 750 µl de solução deproteínizada RRPB à coluna R da coluna de adsorção e centrifugue a 10.000 rpm ($\sim 10.000 \times g$) por 1 minuto.
6. **(Opcional)** Preparação da solução de trabalho de DNase I: Pegue 10 µl da solução estoque de DNase I em um novo tubo EP livre de RNase, adicione 90 µl do tampão de DNase I RDB e misture (a solução de trabalho de DNase I é melhor ser preparada imediatamente antes do uso).
7. **(Opcional)** Adicione 100 µl da solução de trabalho de DNase I à coluna R da coluna de adsorção e deixe à temperatura ambiente por 10 minutos. (Os passos 6 e 7 são passos para remover DNA, devem ser escolhidos de acordo com as necessidades dos experimentos subsequentes).
8. **(Opcional)** Adicione 600 µl de solução deproteínizada RRPB à coluna R da coluna de adsorção, deixe em repouso por 2 minutos e centrifugue a 10.000 rpm ($\sim 10.000 \times g$) por 1 minuto. (Se o conteúdo de proteína da amostra for alto, pode-se escolher adicionar o passo de remoção de proteína).
9. Adicione 500 µl de solução de lavagem RWB à coluna R da coluna de adsorção (verifique se foi adicionado etanol anidro antes do uso), deixe à temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 1 minuto. Retorne a coluna R ao tubo de coleta.
10. Repita o passo 9.
11. Centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 2 minutos e descarte o líquido de resíduos. Coloque a coluna R da coluna de adsorção em um banco limpo por vários minutos para secar completamente a solução de lavagem remanescente no material de adsorção.

Nota: O objetivo deste passo é remover a solução de lavagem remanescente da coluna R da coluna de adsorção. A solução de lavagem remanescente pode afetar os experimentos subsequentes de RT e outros.

12. Transfira a coluna R da coluna de adsorção para um novo tubo centrifugo livre de RNase e adicione 30-100 µl de ddH₂O livre de RNase ao meio da membrana de adsorção. Deixe à temperatura ambiente por 2 minutos, centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 2 minutos para obter a solução de RNA.

Nota: O volume do tampão de eluição não deve ser inferior a 30 µl. Um volume muito pequeno afetará a eficiência de recuperação. Armazene a solução de RNA a -70°C .

Uso exclusivo para pesquisa.

Detecção de Pureza e Concentração de RNA

Integridade: O RNA pode ser detectado por eletroforese em gel de agarose comum (condições de eletroforese: concentração do gel 1,2%; tampão de corrida 1 × TAE; 120V, 20 min). Como 70% - 80% do RNA nas células é rRNA, você deve ver bandas de rRNA muito óbvias sob UV após a eletroforese. A quantidade de rRNA 28S é cerca de duas vezes maior que a de rRNA 18S, indicando que a integridade do RNA é melhor.

Razão OD260 / OD280: É um indicador do grau de contaminação por proteínas. RNA de alta qualidade tem leituras de OD260 / OD280 entre 1,8-2,1, sendo que uma razão de 2,0 é um indicativo de RNA de alta qualidade. A leitura de OD260 / OD280 é afetada pelo pH da solução usada no ensaio. A mesma amostra de RNA, assumindo uma leitura de OD260 / OD280 de 1,8-2,1 medida em uma solução de Tris 10 mM, pH 7,5, pode ler entre 1,5-1,9 em uma solução aquosa, mas isso não indica RNA impuro.

Concentração: Pegue uma quantidade determinada de extrato de RNA, dilua n vezes com ddH₂O livre de RNase, ajuste o espectrofotômetro com ddH₂O livre de RNase, pegue a solução diluída para a medição de OD260 / OD280 e calcule a concentração de RNA de acordo com a fórmula a seguir: Concentração final (ng / µl) = (OD260) × (múltiplo de diluição n) × 40.

Uso exclusivo para pesquisa.