**RNA核酸免提取试剂盒**

**试剂盒应用**

本试剂盒采用专利裂解液配方，有针对性的从组织、培养细胞、拭子、血液、尿液、唾液、环境样本中获得病毒RNA。裂解、提取和纯化只需10分钟。该配方中添加RNA保护剂，能够抑制RNA降解、保护RNA完整，从而提高RNA产量。提取后的RNA可直接用于RT-PCR、RT-qPCR、分子克隆、文库构建等实验。

本试剂盒仅供研究使用，不可用于临床、食品、化妆品等领域。

**试剂盒组成**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组分** | **Col-R0502（50T）** | **编号** |
| 裂解液VR | 35 mL | Col-R0502A |
| 洗涤液VRI | 25 mL | Col-R0502B |
| 洗涤液VRII | 12 mL | Col-R0502C |
| 洗脱液VR | 5 mL |  |
| RNA吸附柱 | 50套 | Col-R0502E |

**备注：第一次使用前，在洗涤液VRII中加入48mL无水乙醇，并标记“√”和时间，避免重复加入。**

**保存条件**

室温保存一年。

**自备材料**

水浴锅或金属浴、无水乙醇、1.5mL无RNase离心管

**使用方法**

1. **样本处理方法**
	1. **从动物组织中提取**
		1. 取20-100mg组织样本放入液氮中充分研磨，加入700μL裂解液VR，颠倒混匀。

或者取20-100mg组织样本加入700μL裂解液VR，加入1颗钢珠，放入组织研磨器中，研磨1-2分钟。

* + 1. 55℃孵育1分钟。12,000rpm离心1分钟。

1.1.3 取500μL上清加入250μL无水乙醇，充分混匀。按照步骤2.1-2.7进行操作。

**1.2 从悬浮细胞中提取**

1.2.1 细胞1,000rpm离心5分钟，收集细胞沉淀。

1.2.2 细胞数量<5×106个时，加入500μL裂解液DV。细胞数量为5×106~1×107个时，加入700μL裂解液VR。轻轻吹打混匀，55℃孵育1分钟。

1.2.3 12,000rpm离心1分钟。

1.2.4 细胞数量<5×106个时，取450μL上清。细胞数量为5×106~1×107个时，取650μL上清。

1.2.5 加入0.5倍体积无水乙醇，充分混匀。按照步骤2.1-2.7操作。

**1.3 从贴壁细胞中提取**

1.3.1 胰酶消化细胞后1,000rpm离心5分钟，收集细胞沉淀。

1.3.2 细胞数量<5×106个时，加入500μL裂解液DV。细胞数量为5×106~1×107个时，加入700μL裂解液VR。轻轻吹打混匀，55℃孵育1分钟。

1.3.3 12,000rpm离心1分钟。

1.3.4 细胞数量<5×106个时，取450μL上清。细胞数量为5×106~1×107个时，取650μL上清。

1.3.5 加入0.5倍体积无水乙醇，充分混匀。按照步骤2.1-2.7操作。

**1.4 从血液、尿液、唾液、细胞上清液中提取**

1.4.1 300μL样本中加入500μL裂解液VR。颠倒混匀，55℃孵育1分钟。

1.4.2 加入400μL无水乙醇，上下颠倒混匀。按照步骤2.1-2.7操作。

**1.5 从拭子中提取**

1.5.1 拭子置于700μL裂解液VR中，颠倒混匀，55℃孵育1分钟。

1.5.2 加入350μL无水乙醇，上下颠倒混匀。按照步骤2.1-2.7操作。

1. **提取步骤**

2.1 1全部加入RNA吸附柱中（如有需要可离心两次），12,000rpm离心1分钟，倒掉收集管中废液。

2.2 向RNA吸附柱中加入500μL洗涤液VRI，12,000rpm离心30秒，倒掉收集管中废液。

2.3 向RNA吸附柱中加入500μL洗涤液VRII，12,000rpm离心30秒，倒掉收集管中废液。

2.4 重复步骤2.3一次。

2.5 12,000rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。

2.6 将RNA吸附柱放入新1.5mL无RNase离心管中，加入30-50μL洗脱液VR，室温放置1分钟。

2.7 12,000rpm离心2分钟，得到RNA溶液，-80℃保存。

**注意事项**

1. 务必在超净台中进行操作，常换手套，防止RNA降解。
2. 尽可能使用新鲜样本进行RNA提取。
3. 使用无DNase无RNase的吸头和离心管，防止RNA降解，常更换吸头，防止交叉污染。
4. 为了提高洗脱效率，可提前将洗脱液VR置于65℃水浴后再使用。