



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ EASYspin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 RN07
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

EASYspin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

目录号: RN07

目录编号	包装单位
RN0702	50次

❖ 适用范围:

适用于快速提取普通动物细胞和易裂解动物组织总RNA,

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次
裂解液 RLT	室温	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在 37℃ 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温 (4℃ 或者 -20℃) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果, 因此运输和储存均在室温下 (15℃—25℃) 进行。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍:

独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 然后用乙醇调节结合条件后, RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物, 蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ 产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚, 氯仿, Beta 巯基乙醇等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速, 简捷, 单个细胞样品操作一般可在 10 分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.1-2.2 (100% 纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右, 很多公司的产品因为残留蛋白或者 DNA 较多, 造成比值降低, 无法达到 2.2 这个纯度标准, 因此降低要求 1.9-2.0 就凑合使用了, 但是艾德莱的产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准)。

❖ 注意事项

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000 rpm的台式离心机即可。
2. 样品处理量绝对不要RNA吸附柱RA处理能力，否则可能反而造成产量降低。不同组织细胞种类RNA相差极大，COS细胞RNA含量丰富，超过 3×10^6 细胞就会超过柱子吸附能力。所以开始摸索实验条件时，如果不清楚样品RNA含量时宁可使用较少的样品处理量，如细胞不超过 $3-4 \times 10^6$ ，组织不超过10mg。将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
3. 裂解液RLT和去蛋白液RW1中含有盐酸胍/异硫氰酸胍化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
4. 预防RNase 污染，应注意以下几方面：
 - 1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase 污染。
 - 2) 使用无RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - 3) RNA 在裂解液RLT中时不会被RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4 小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH 中浸泡10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
 - 4) 配制溶液应使用无 RNase 的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v)，37℃放置过夜，高压灭菌。）
5. 关于DNA 的微量残留：

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留（DNase 消化也无法做到 100%无残留），本公司的 EASYspin RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术，绝大多数 DNA 已经被清除，不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR 和荧光定量 PCR。个别特殊情况如 DNA 含量过于丰富造成残留或者要进行严格的 mRNA 表达量分析荧光定量

PCR，我们建议在进行模板和引物的选择时：

- 1) 选用跨内含子的引物,以穿过 mRNA 中的连接，这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
 - 2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
 - 3) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理以提高效果。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(cleanup)，请联系我们索取具体操作说明书。
 - 4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。请联系我们索取具体操作说明书（艾德莱 DNA 酶柱上消化试剂盒货号：RN34）。
6. RNA 纯度及浓度检测：

完整性： RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件：胶浓度 1.2%；0.5×TBE 电泳缓冲液；150v，15 分钟)检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA，电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。动物 rRNA 大小分别约为 2 kb 和 1kb，分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍，否则提示 RNA 样品的降解。出现小的弥散片状或条带消失表明样品严重降解。但是应该注意区分是提取出来的 RNA 样品本身降解了，还是提取出来的 RNA 是完好的，只是在电泳过程中降解的。

4. **纯度：** OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的参考指标。高质量的 RNA，OD260/OD280 读数在 2.1-2.2 之间 100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右（100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右，很多公司的产品因为残留蛋白或者 DNA 较多，造成比值降低，无法达到 2.2 这个纯度标准，因此降低要求 1.9-2.0 就凑合使用了，但是艾德莱的产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准）。OD260/OD280 读数受测量使用的机器影响，也受测定所用稀释溶液的 pH 值影响。微量分光光度计一般不需要稀释，不受稀释溶液的 PH 值影响。但是同一个 RNA 样品，如果测量的时候机器要求稀释后测量，假定在 10mM Tris，pH7.5 稀释溶液中测出的

OD260/OD280 读数 1.9-2.1 之间，在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间，但这并不表示 RNA 不纯。

浓度：取一定量的 RNA 提取物，用 RNase-free 水稀释 n 倍，用 RNase-free 水将分光光度计调零，取稀释液进行 OD260, OD280 测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度 (ng/μl) = (OD260) × (稀释倍数 n) × 40。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

提示：

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇！

1. 培养细胞

A1. 贴壁细胞：不需消化，彻底吸干净培养液体后直接加推荐量裂解液 RLT（见附录一）反复吹打细胞裂解（裂解后直接接**操作步骤项 3**）；不方便直接裂解的培养容器，可以用细胞刮子刮下细胞，或者胰蛋白酶消化后吹打下来收集细胞到 1.5ml 离心管。

A2. 悬浮细胞：收集 $<10^7$ 悬浮细胞到一个 1.5ml 离心管。

B. 13,000rpm 离心 10 秒（或者 300g 离心 5 分钟），使细胞沉淀下来。完全吸弃上清，留下细胞团，注意不完全弃上清会稀释裂解液导致产量纯度降低。

C. 轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加 350μl ($<5 \times 10^6$ 细胞) 或 600μl (5×10^6 - 1×10^7 细胞) 裂解液 RLT，用移液器反复吹打充分裂解（直到看不细胞团为止）。

D. 立刻接**操作步骤项下 3**。

2. 动物组织（例如鼠肝脑）

A1. 匀浆器匀浆：新鲜组织加入 350μl (<20 mg 组织) 或者 600μl (20-30mg 组织) 的裂解液 RLT 后玻璃匀浆器或电动匀浆器将组织彻底研磨匀浆。

A2. 液氮研磨+匀浆：在液氮中研磨组织成细粉后，取适量组织细粉(20mg/30mg) 转入装有 350 μ l/600 μ l 组织裂解液 RLT 的 1.5ml 离心管中，剧烈振荡 20 秒，难裂解样品可用移液器反复吹打匀浆。

注意：若研磨匀浆后不溶物碎片太多，可将匀浆后裂解物 13,000rpm 离心 3 分钟沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物。将上清液转移到新的 1.5ml 离心管内。

B. 立刻接操作步骤项下 3。

3. 较精确估计裂解物（上清）体积，加入等体积的 70%乙醇（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，**立即吹打混匀**，不要离心。
4. 立刻将混合物(每次小于 720 μ l，多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
5. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1，室温放置 30 秒，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
6. 加入 500 μ l 漂洗液 RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW，重复一遍。
7. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
8. 取出吸附柱 RA，放入一个干净 1.5ml 离心管中，根据预期 RNA 产量**在吸附膜的中间部位**加 30-50 μ l RNase free water，室温放置 1 分钟，1,3,000 rpm 离心 1 分钟得到 RNA 溶液。

洗脱缓冲液体积不应少于 30 μ l，体积过小影响回收效率。如果需要得到更大浓度的 RNA，将离心得到的 RNA 溶液加回到吸附柱重复洗脱一遍。

附录一：贴壁培养细胞数量表

培养器皿	底面积 (cm ²)	加培养液量 (mL)	可获细胞量
24 孔培养板	2	1.0	5×10^5
6 孔培养板	9.6	2.5	2.5×10^6
3.5cm 培养皿	8	3.0	2.0×10^6
6cm 培养皿	21	5.0	5.2×10^6
25cm 塑料培养瓶	25	5.0	5.2×10^6
100ml 玻璃培养瓶	33	10.0	7×10^6

注：一般情况下，3.5cm 直径培养皿或者更小培养容器加 350μl 裂解液 RLT，6cm 直径培养皿或者更大培养容器加 600μl 裂解液 RLT。最大处理量不超过 10^7 个细胞。