

版本号:250802

EASYspin Fibrous RNA Kit**EASYspin 纤维类组织 RNA 快速提取试剂盒 (With DNase I)**

目录号: RN44

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次(RN4401)
裂解液 FLT	室温	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	35 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	40 ml
蛋白酶 K	4℃	1 ml
DNase Buffer	-20 °C	2.5 ml
RNase free DNase I	-20 °C	250 µl
RNA 吸附柱和收集管	室温	50 套

本试剂盒（低温组分除外）在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 运输和储存（低温组分除外）均在室温下进行。
2. 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。
3. 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输。收到后，不超过 25℃ 室温至少保存 6 个月，4℃ 保存 12 个月，-20℃ 保存 2 年。

❖ 产品介绍:

纤维丰富的组织如骨骼肌、心脏、主动脉、食道、皮肤等因为含有大量的收缩性蛋白、结缔组织和胶原蛋白, 这些组织非常难裂解, 用传统的 TRIzol 常常无法提取或者降解。EASYspin 纤维组织 RNA 试剂盒的操作流程将蛋白酶 K 和 RNase-free DNase 消化步骤结合起来, 在 RNA 分离的同时能降解蛋白和基因组 DNA, 纯化得到的高品质总 RNA 的产量更高。本制品适用于大于 200 nt 的 RNA, 因此 RNA 产物不包括 5S rRNA、tRNA 或其他小分子量 RNAs, 产物占细胞内总 RNA 的 15-20%。

独特的裂解液/β-巯基乙醇迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 裂解液稀释后, 样本经蛋白酶 K 处理。离心使碎片沉淀。然后用乙醇调节结合条件后 RNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 在离心柱中加入 DNase 去除残留的 DNA。最后通过一系列快速的漂洗-离心的步骤, 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. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚, 氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.9~2.2, 基本无 DNA 残留, 可用于 RT-PCR、RT-qPCR、Northern-blot 和各种实验。

❖ 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 的传统台式离心机,
2. 需要自备乙醇, β-巯基乙醇, 一次性注射器, 研钵, 水浴锅等。
3. 裂解液 FLT 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物, 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. 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; 150 V, 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。好的 RNA 产物在普通的琼脂糖电泳,28S 和 18S 大约在 2 Kb 和 1Kb 位置,而且可以随着 RNA 空间二级结构不同,电泳条带所在位置不是固定的,动物 RNA 样品中最大 rRNA 28S 亮度应为次大 rRNA 18S 亮度的 1.5-2.0 倍,否则表示 RNA 样品可能有降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度: OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。最高质量的 RNA, OD260/OD280 读数 (10mMTris, pH7.5) 在 2-2.2 之间。

❖ 操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量无水乙醇!
- ⇒ 操作前在裂解液 FLT 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%, 如 1 ml FLT 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 FLT 4°C 可放置一个月。

1. 充分破碎匀浆 (非常重要, 否则严重降低产量)

a. 电动破碎匀浆 (首选强烈推荐, 产量最高结果最稳定): 取约 10–20 mg (< 30 mg) 新鲜组织, 加入 300 μ l 裂解液 FLT 后用电动刀片匀浆机 (Rotor-Stator 如 TissueRupter) 或者电动玻璃研磨机 (Bead Mill 如 TissueLyser) 按照机器使用说明彻底破碎匀浆组织细胞。

b. 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 10–20 mg (< 30 mg) 转入装有 300 μ l 裂解液 FLT 的 1.5ml 离心管中, 用手剧烈振荡 20 sec, 充分裂解。用带钝针头的一次性 1 ml(配 0.9 mm 针头) 注射器抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 sec), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。将匀浆转入新离心管。

c. 研钵研磨匀浆: 取适量组织细粉 10–20 mg (< 30 mg) 放入小研钵后, 迅速加入 300 μ l 裂解液 FLT 后直接室温充分研磨匀浆。将匀浆转入新离心管。

▲ 如果匀浆沾在研钵内损失比较大, 可以按照比例适当提高起始组织用量和裂解液 FLT 用量。此外, 也可以先用液氮研磨组织成细粉, 然后液氮刚刚蒸发完的时候加入裂解液 FLT 充分研磨匀浆, 可以提高研磨效果。

2. 吸取 590 μ l RNase-free H₂O 至匀浆中。加入 20 μ l 蛋白酶 K, 移液器吹打混匀。

3. 55°C 水浴 10 min。
4. 室温下以 13, 000 rpm 离心 3 min。这样将会形成小量的组织碎片沉淀，而且在上清的顶部可能看见少量的漂浮物。
5. 转移上清至一个新的 1.5ml 离心管中。
 - ▲ 转移时不要带入沉淀物，而且移液枪头必须放在上清漂浮物之下。漂浮物通常可能会黏附在枪头的外壁，注意不能将其带入离心管中。
6. 较精确估计裂解物(上清)体积，加入 0.5 体积的无水乙醇(一般为 450 μ l)，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。
7. 立刻将混合物(每次小于 720 μ l，可以分两次加入)加入同一个吸附柱(吸附柱放入收集管中)中，13, 000 rpm 离心 30 sec，弃掉废液。
8. **DNase I 工作液配制**：取一个新的 1.5ml 离心管，加入 45 μ l DNase I buffer 和 5 μ l RNase free DNase I，轻轻吹打混匀成 DNase I 工作液(处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液)，置冰上备用。
9. 向吸附柱中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1，13, 000 rpm 离心 15 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
 - ▲ 如果不需要做 DNA 酶柱上消化，此步骤可以加 700 μ l 去蛋白液 RW1，13, 000 rpm 离心 15 sec，然后直接接步骤 12 完成后续步骤即可。
10. 向吸附柱中央加入 50 μ l 的 DNase I 工作液，室温(20-30°C)放置 15 min。注意直接将工作液滴在膜中央上，不要让工作液滴在 O 型圈或是离心柱管壁上。
11. 向吸附柱中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1，13, 000 rpm 离心 15 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
12. 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 15 sec，弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW，重复一遍。
13. 将吸附柱放回空收集管中，13, 000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
14. 将吸附柱转移至新的 1.5 ml 离心管中，向吸附柱膜中央悬空滴加 30-50 μ l 的 RNase-free ddH₂O，静置 2 min，13, 000 rpm 离心 1 min。
 - ▲ 洗脱体积建议不少于 30 μ l，体积过小会影响核酸回收效率。
 - ▲ 以下步骤都可以帮助提高 RNA 产物浓度：
 - RNase-free ddH₂O 于洗脱前先在 90°C 预热；
 - 将第一次洗脱液重新加入吸附柱进行第二次洗脱。