



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ **EASYspin Plus** 大量组织/细胞RNA快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 **RN41**
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

EASYspin Plus 大量组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

目录号: **RN41**

| 目录编号 | 包装单位 |
|---------------|------------|
| RN4101 | 10次 |

❖ **适用范围:**

适用于快速提取动物细胞和易裂解动物组织总RNA, 使用独有基因组DNA清除柱技术确保有效清除gDNA残留, 不需要使用DNase消化, RNA可直接用于PCR, 荧光定量PCR。

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

| 试剂盒组成 | 保存 | 10 次 |
|-----------------------------------------|----|--------------------------------------------|
| 裂解液 RLT Plus | 室温 | 100 ml |
| 去蛋白液 RW1 | 室温 | 120 ml |
| 漂洗液 RW | 室温 | 25 ml X 2 <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i> |
| 70%乙醇 | 室温 | 15ml X 2 <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i> |
| RNase-free H₂O | 室温 | 10 ml |
| 基因组 DNA 清除柱 和收集管 | 室温 | 10 套 |
| RNase-free 吸附柱 RA 和收集管 | 室温 | 10 套 |

本试剂盒在室温储存 6 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°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温（4°C 或者 -20°C）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°C - 25°C）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:

本公司独家推出 EASYspin 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，又独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后裂解混合物通过一个基因组 DNA 清除柱，基因组 DNA 被清除而 RNA 穿透滤过。滤过的 RNA 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. 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。
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 60 分钟内完成。





3. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留,得到的 RNA 不需要 DNase 消化,可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD_{260}/OD_{280} 典型的比值达 1.9~2.0, 基本无 DNA 残留,可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

❖ 注意事项

1. 所有的离心步骤均可在室温完成, 使用可容纳50ml 离心管的离心机。
2. 样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱**DA**和**RNA**吸附柱**RA**处理能力, 否则造成**DNA**残留或者产量降低。不同组织细胞种类RNA/DNA相差极大, 例如胸腺脾脏DNA含量丰富, 超过100mg就会超过柱子处理能力。COS细胞RNA含量丰富, 超过 6×10^7 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**DNA/RNA**含量时宁可使用较少的样品处理量, 如细胞不超过 **6×10^7** , 组织不超过**200mg**。将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
3. 裂解液RLT Plus 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. 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,本公司的 EASYspin 系列 RNA 提取产品,由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜,在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留(一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见)影响不是很大,如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR,我们建议在模板和引物的选择时:

- 1) 选用跨内含子的引物,以穿过mRNA中的连接区,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。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。
5. 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 5 kb 和 2kb, 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, 否则表示 RNA 样品的降解。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。高质量的 RNA, OD260/OD280 读数 (10mMTris, pH7.5) 在 1.8-2.1 之间。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品, 假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280 读数 1.8-2.1 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, 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. 组织培养细胞

- a. 收集 $<2 \times 10^8$ 悬浮细胞到一个合适大小离心管，对于贴壁细胞，孔板培养可以直接裂解，细胞瓶培养应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
- b. 10,000-13,000x g 离心 20 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. 轻弹管壁将细胞沉淀**完全松散重悬**，加 5ml ($<10^8$ 细胞)或 10ml (1×10^8 - 2×10^8 细胞) 裂解液 RLT Plus，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒充分裂解。
- d. 匀浆：（处理细胞量极少时 $<2 \times 10^6$ 一般不需要，涡旋振荡一分钟匀浆）。用带钝针头的一次性 10 ml(配 0.9mm 针头) 注射器剧烈抽打裂解物 10 次以上或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 60 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。
- e. 将裂解混合物或匀浆混合物全部加到 DNA 清除柱上(清除柱放在收集管内)。
- f. 立刻接**操作步骤**项下 3。

2. 动物组织（例如鼠肝脑）

- a. **电动匀浆：**新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块,加入 5ml(<250 mg 组织)或者 10ml(400-500mg 组织)的裂解液 RLT Plus 后电动彻底匀浆 1 分钟。
- 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(250mg/500mg) 转入装有 5ml/10ml 组织裂解液 RLT Plus 的 50ml 离心管中,用手剧烈振荡 20 秒,充分裂解。用带钝针头的一次性 10 ml(配 0.9mm 针头) 注射器剧烈抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 60 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。

c. 将匀浆后裂解物 10,000-13,000x g 离心 5 分钟,沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物,将裂解物上清全部加到 DNA 清除柱上(清除柱放在收集管内)。

d. 立刻接**操作步骤**项下 3。

3. 立刻 10,000-13,000x g 离心 5 分钟,保留滤过液(RNA 在滤过液中)。

确保离心后液体全部滤过去,膜上没有残留,如有必要,可以加大离心力和离心时间。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积(通常为 5ml/10ml,滤过时候损失体积应该减去),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。
5. 将混合物加入一个吸附柱 RA 中,(吸附柱放入收集管中) 10,000-13,000x g 离心 3 分钟(确保全部通过,膜上无残留液体,否则应加大转速和时间),弃掉废液。
6. 加 10ml 去蛋白液 RW1,室温放置 1 分钟, 12,000x g 离心 3 分钟,弃掉废液。
7. 加入 10ml 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 10,000-13,000x g 离心 1-2 分钟,弃掉废液。加入 10ml 漂洗液 RW,重复一遍。
8. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000x g 离心 5 分钟以干燥膜基质残留乙醇,用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇,室温或者烘箱晾干几分钟。
9. 取出吸附柱 RA,放入一个 RNase free 离心管中,根据预期 RNA 产量**在吸附膜的中间部位**加 500 μ l -1ml RNase free H₂O,室温放置 3 分钟,12,000x g 离心 2 分钟。
10. 如果预期 RNA 产量>0.6mg,加 300-500 μ l RNase free H₂O 重复步骤 9,合并两次洗脱液,或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高,分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%,但是浓度要低,用户根据需要选择。