北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co.,Ltd

EASYspin Plus 微量样品 RNA 快速提取试剂盒

目录号 **RN39**

使用手册

实验室使用，仅用于体外

EASYspin Plus 微量样品 RNA 快速提取试剂盒

目录号：RN39

目录编号	包装单位
RN3901	**50次**

❖ **适用范围：**

适用于快速提取微量动物细胞、微切割组织和易裂解动物组织等样品总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	50 次
裂解液 RLT Plus	室温	**20 ml**
去蛋白液 RW1	室温	**40 ml**
漂洗液 RW	室温	**10ml** ***第一次使用前按说明加指定量乙醇***
RNase-free H_2O	室温	**10 ml**
70%乙醇	室温	**9ml RNase-free H_2O** ***第一次使用前按说明加指定量乙醇***
Carrier RNA	—20℃	310μg
基因组 DNA 清除柱和收集管	室温	**50 套**
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	**50 套**
微量研磨杵	室温	**3 根**

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℃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：

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微量样品的细胞和灭活细胞 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特制离心柱内硅基质膜，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 H_20 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 30 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. **所有的离心步骤均在室温完成，**使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。

2. **样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱DA和和RNA吸附柱RA处理能力，否则造成DNA残留或者产量降低。如细胞处理量不超过5x10^5，组织不超过5mg。**

3. **一般本试剂盒最小处理量可以处理10个以上的组织细胞。**

4. 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。**

5. **Carrier RNA 储存液的配制：**在第一次使用Carrier RNA 时，将Carrier RNA（310 μg）溶解在1 ml RNase-free H_2O 中，将溶液分装后储存于-20℃，此时该溶液的浓度为310 μg/ ml（310 ng/μl）；该储存液应避免反复冻融，冻融次数不能超过3 次。（当处理的细胞量小于5000 个或者处理组织量小于10μg时，请在裂解液中加入20ng Carrier RNA。）

6. **Carrier RNA 工作溶液的配制（以配制10 次用量为例）：**将5μl Carrier RNA储存溶液加入34μl 裂解液RL 中，用移液器混匀，将混匀后的溶液6μl 加入54μl 裂解液RL 中， 此时Carrier RNA 终浓度为4 ng/μl，取5μl 终浓度为4 ng/μl 的Carrier RNA 加入裂解液中。

7. 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 Plus 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。）

8. 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 Plus 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。

❖ **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!

⇨ 如果处理的细胞量小于 5000 个或者处理组织量小于 10μg 时，匀浆前请在裂解液中加入 20ng Carrier RNA（按照注意事项 4 和 5 指示）

1. 组织培养细胞

a. 收集<5x10^5 悬浮细胞到一个 1.5ml 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. 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. 轻弹管壁将细胞沉淀**完全松散重悬**，加 350μl（<5x10^5 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<1x10^5 一般不需要，涡旋振荡一分钟匀浆）。用带钝针头的一次性 1 ml(配 0.9mm 针头) 注射器抽打裂解物 5-10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 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. 接**操作步骤**项下 3。

2. 动物组织（例如鼠肝脑）

a. 电动匀浆： <5mg 组织加入 350μl 裂解液 RLT Plus 后电动彻底匀浆 20-40 秒。

b. 研磨杵+匀浆：1.5ml 离心管内，加入 100μl 裂解液 RLT Plus ，加入<5mg 组织立刻用微量研磨杵研磨匀浆完全。补足裂解液 RLT Plus 到 350μl。用带钝针头的一次性 1 ml(配 0.9mm 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 秒) ，可以剪切 DNA，降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。

c. 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(<5mg)转入装有 350µl 组织裂解液 RLT Plus 的 1.5ml 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 1 ml(配 0.9mm 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 秒),可以剪切 DNA，防堵塞柱子和提高产量。

d. 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, 将裂解物上清全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

e. 接**操作步骤**项下 3。

3. 13,000 rpm 离心 30 秒，保留滤过液（RNA 在滤过液中）。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积（通常为 350µl，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. 立刻将混合物(每次小于 700µl,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。

6. 加 700µl 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，12，000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

7. 加入 500µl 漂洗液 RW**（请先检查是否已加入无水乙醇!）**，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500µl 漂洗液 RW,重复一遍。

8. 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。

9. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，**在吸附膜的中间部位**加 15-20µl RNase free water（事先在 70-90℃水浴中加热可提高产量）， 室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

减少洗脱体积可以提高 RNA 浓度，但是 RNA 产量会降低，用户根据需要选择。