
版本号:160902

EASYspin Plus Bone Tissue RNA Kit
EASYspin Plus 骨组织 RNA 快速提取试剂盒

目录号: RN54

❖ **适用范围:**

适用于快速提取骨组织细胞总RNA, 使用独有基因组DNA清除柱技术可有效清除电泳可见gDNA残留, RNA可用于反转录PCR, 荧光定量PCR等。

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50次(RN5401)
裂解液 CLB	室温	50 ml
PLANTaid	室温	5 ml
裂解液 RLT Plus	室温	25 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
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

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 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。
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。

❖ 产品介绍:

骨组织坚硬、骨细胞密度低、而且外周基质含有大量黏蛋白（蛋白多糖）和 RNA 难以分离，无法用传统 Trizol 法进行高质量提取。本试剂盒采用独有的不含苯酚/氯仿配方的裂解液，并添加多种成分去除骨组织蛋白多糖。同时独特基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化，可用于反转录 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，离心沉淀去除多糖和次级代谢产物，然后裂解混合物用乙醇调节 RNA 结合吸附到基因组 DNA 清除柱，然后 RNA 被选择性洗脱滤过，吸附在基因组 DNA 清除柱上的残留 DNA 无法洗脱连同柱子一起丢弃从而清除掉 DNA。滤过的 RNA 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，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，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 简捷，单个样品操作一般可在 35 分钟内完成，世界上最简单快速的试剂盒。
3. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化，可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 适应性广泛，可以提取各种骨组织包括矿化骨组织。
5. 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，Northern-blot，二代测序和各种实验。

❖ 注意事项

1. 所有的离心步骤均可在室温完成（4℃离心也可以），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. 需要自备乙醇，研钵或者其它合适的破碎骨组织装置。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱DA和和RNA吸附柱RA处理能力，否则造成DNA残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品DNA/RNA含量时可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
4. 裂解液CLB和RLT Plus 和去蛋白液RW1中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，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. 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。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柱上消化处理。购买DNA酶柱上消化试剂盒(货号: RN34)前可先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 瓶加入指定量无水乙醇!
- ⇒ 取 1ml 裂解液 CLB 至离心管内(如果 CLB 有析出或者沉淀需先置于 65° C 水浴重新溶解),在裂解液 CLB 中加入 100μl PLANTaid,颠倒混匀后 65° C 水浴中预热。多个样品按照比例放大准备。

1. 液氮研磨法:

- a. 骨钳夹碎骨组织后放入研钵,加入液氮后反复研磨成细粉,注意液氮蒸发后不断补加保存液氮一直存在。
- b. 转移 100mg 细粉加至预热的裂解液 CLB (已加有 PLANTaid) 离心管中。立即剧烈涡旋 30-60 秒或者用吸头吹打混匀裂解直得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒),可以剪切 DNA,降低粘稠度和提高产量。
- c. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

2. 其它骨组织破碎方法:

- a. 取 100mg 骨组织加入 1ml 预热的裂解液 CLB (已加有 PLANTaid) 高速均质仪粉碎匀浆。或者取 100mg 液氮冷冻包埋切片粉碎的骨头加入裂解液 CLB (已加有 PLANTaid) 粉碎匀浆。
- b. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

3. 短时放回 65° C 水浴中 (10 min), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。

4. 将裂解物 13,000 rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。

5. 取裂解物上清（在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清，**这样可以提高产量**）转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积)，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。

若上清表面有漂浮物，用吸头挑开吸取下面液体即可。

6. 将混合物(每次小于 720 μ l，多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱中，（清除柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 2 分钟，弃掉废液。

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。

7. 将基因组 DNA 清除柱子放在一个干净 2ml 离心管内(不用 RNase free 或者 DEPC 处理，一般干净的新离心管即可。也可使用 RNA 吸附柱配套的新的干净收集管)，在基因组清除柱内加 500 μ l 裂解液 RLT Plus，13,000 rpm 离心 30 秒，收集滤液（RNA 在滤液中），用微量移液器较精确估计滤过液体积（通常为 450-500 μ l 左右，滤过时候损失体积应该减去），加入 0.5 倍体积的无水乙醇，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。

8. 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 2 分钟，弃掉废液。

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。

9. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
10. 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。
11. 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。
12. 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 30-50 μ l RNase free water（事先在 70-90 $^{\circ}$ C 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。
13. 如果预期 RNA 产量>30 μ g，加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 12，合并两次洗液，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。