



- ◆ **EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒**
- ◆ **目录号 RN28**
- ◆ **使用手册**
- ◆ **实验室使用，仅用于体外**



---

## EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

目录号: RN28

目录编号	包装单位
RN2802	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, 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可直接用于反转录荧光定量PCR, Northern-blot等下游实验。

❖ 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	30 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	5 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H <sub>2</sub> O <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
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. 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，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 H<sub>2</sub>O 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 15 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，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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。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5mg就会超过柱子处理能力。COS细胞RNA含量丰富，超过 $3 \times 10^6$ 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DNA/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 Plus 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 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 $150^{\circ}\text{C}$ 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)， $37^{\circ}\text{C}$ 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 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。

5. **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 Plus（见附录一）反复吹打细胞裂解，取裂解后的匀浆液全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）直接接**操作步骤 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 ( $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  细胞)裂解液 RLT Plus，用移液器反复吹打充分裂解（直到看不细胞团为止）。

**D.** 将裂解混合物全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

**E.** 立刻接**操作步骤 3**。

---

## 2. 动物组织（例如鼠肝脑）

**A1. 匀浆器匀浆：**新鲜组织加入 350 $\mu$ l(<20mg 组织)或者 600 $\mu$ l(20-30mg 组织)的裂解液 RLT Plus 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 $\mu$ l/600 $\mu$ l 组织裂解液 RLT Plus 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。将上清液加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

B. 将研磨均匀的匀浆液全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

C. 立刻接**操作步骤 3**。

3. 立刻 13,000 rpm 离心 1 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. 较精确估计滤过液体积（通常为 350 $\mu$ l/600 $\mu$ l，滤过时候损失体积应该减去，可用移液器吸取滤液估计体积），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。

5. 立刻将混合物(每次小于 720 $\mu$ 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。

6. 加 700 $\mu$ l 去蛋白液 RW1，室温放置 30 秒，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

7. 加入 500 $\mu$ 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 $\mu$ l 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 $\mu$ 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  $\mu$ 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 <sup>2</sup> )	加培养液量 (ml)	可获细胞量
24 孔培养板	2	1.0	5 × 10 <sup>5</sup>
6 孔培养板	9.6	2.5	2.5 × 10 <sup>6</sup>
3.5cm 培养皿	8	3.0	2.0 × 10 <sup>6</sup>
6cm 培养皿	21	5.0	5.2 × 10 <sup>6</sup>
25cm 塑料培养瓶	25	5.0	5.2 × 10 <sup>6</sup>
100ml 玻璃培养瓶	33	10.0	7 × 10 <sup>6</sup>

注：一般情况下，3.5cm 直径培养皿或者更小培养容器加 350 $\mu$ l 裂解液 RLT Plus，6cm 直径培养皿或者更大培养容器加 600 $\mu$ l 裂解液 RLT Plus。最大处理量不超过 10<sup>7</sup> 个细胞。