

版本号:250422

EASYspin RNA micro Kit(With DNase I)**EASYspin 超微量 RNA 快速提取试剂盒 (With DNase I)**

目录号: RN56

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50次(RN5601)
裂解液 RLT	室温	20 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说明加无水乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
PLANTaid	室温	5 ml
DNase Buffer	-20 °C	1.25 ml
RNase free DNase I	-20 °C	100 µl
超微量 RNA 离心柱和收集管	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。

❖ 产品介绍：

本品为超微量 RNA 提取的专用试剂盒。适用于从超微量的细胞、组织、昆虫、植物、细菌等样品中提取总 RNA。处理范围一般为细胞（1 个- 10^6 个）或者组织（< 5 mg）。配有 DNA 酶柱上消化试剂，得到的 RNA 无 DNA 残留，可直接用于下游荧光定量 PCR 或者高通量测序等试验。

❖ 产品特点：

1. 特殊无垫圈离心柱设计确保离心后无液体残留和污染。保证了回收 RNA 高纯度。
2. 特殊超微量离心柱设计将吸附膜面积缩小了几倍，最大限度的减少了 RNA 黏附在吸附膜上的损失，同时可以最低 6 μ l 超小体积洗脱，保证了提取 RNA 的高浓度。
3. 超微量离心柱和其它厂家的不同，它采用了艾德莱独特的疏水不吸附核酸的垫片底托+硅胶膜设计，增加的底托可以承受高达 2 万转的高速离心，不会导致硅胶膜高速离心中脱落掉下去。而高速离心可以确保把杂质，盐离子，乙醇都甩干净，最大限度的提高了纯度。
4. 添加的独有的植物 RNA 助提剂 PLANTaid 可以清除植物多糖多酚或者昆虫的糖原，几丁质多糖等杂质，提高富含杂质的昆虫和植物 RNA 的提取质量。
5. 完全不使用有毒的苯酚/氯仿/ β 巯基乙醇等试剂。

❖ 注意事项

1. 所有的离心步骤均在室温完成。
2. 部分含多糖多酚、几丁质多糖或者次级代谢产物丰富的昆虫样品，或者植物样品，提取效果不佳（如降解、产量低）可以尝试在裂解液 RLT 中添加 PLANTaid 后提取。具体添加比例为 **10 体积（1ml）RLT：1 体积（100 μ l）PLANTaid**。
3. 关于 DNA 酶柱上消化的使用：
 - 1) 普通 RT-PCR 做克隆基因：可以做也可以省略 DNA 酶柱上消化步骤。
 - 2) 荧光定量 RT-qPCR：
 - (A) 默认加上 DNA 酶柱上消化步骤。下游采用不含基因组清除的反

转录试剂盒即可（如艾德莱货号：PC58）。

（B）如果样品特殊困难，造成浓度或者完整性不佳的时候，可以尝试省略DNA酶柱上消化步骤。但是下游建议采用含基因组清除的反转录试剂盒即可（如艾德莱货号：PC70）。

- 3) 高通量测序/转录组测序：要求特别高的下游实验必须做DNA酶柱上消化步骤，或者按照高通量测序公司的要求进行（有的高通量测序公司认为微量DNA残留不影响高通量测序，可以省略）。

❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

⇒ 使用前请仔细阅读注意事项。

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶按照标签指示加入无水乙醇，混匀！

整个操作步骤是由 3 个步骤组成（所有步骤室温操作）：

（一）样品裂解匀浆 （二）样品清理 （三）样品纯化

（一）样品裂解匀浆

a. 组织：5 mg 以内的组织加 300 μ l 的裂解液 RLT 后匀浆。

▲ PLANTaid 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富困难样品不可缺少成分。

b. 贴壁细胞：去除液体培养基后，直接往培养板中加入裂解液 RLT 溶解细胞，并用移液枪反复吹打充分裂解混匀。依据细胞的数量来决定所需的裂解液 RLT（ 10^5 细胞以内加 100 μ l， 10^6 细胞以内加 300 μ l）。

c. 悬浮细胞：离心沉淀细胞($\leq 500 \times g$)，完全去除上清后用裂解液 RLT 重悬细胞沉淀。可短暂涡旋振荡。

d. 其它组织：其他难裂解的组织，细菌，酵母，植物匀浆需配合酶解破壁，或者高速珠磨均质仪器和适合裂解珠（玻璃珠，钢珠，锆珠等）。

（二）样品清理

此步骤为可选步骤，主要是针对动植物组织和细胞，对于样品量很低（细胞数 $\leq 10^5$ ）或者匀浆后能充分裂解均一的样品无需此步骤。

若植物研磨匀浆后不溶物碎片太多，可将匀浆后裂解物 13,000 rpm 离心 1 min 沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物。将上清液转移到新的 1.5 ml 离心管内。

(三) 样品纯化

1. 加入等体积(95-100%)的无水乙醇到上一步的裂解物上清中吹打混匀。
2. 将混合物加入一个超微量 RNA 离心柱中，（离心柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 30 sec，弃掉废液。
3. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1，13,000 rpm 离心 30 sec，弃掉废液。
4. 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。
5. 将离心柱放回空收集管中，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。
6. 取出离心柱，放入一个干净 1.5 ml 离心管中，根据预期 RNA 产量在离心柱膜中央悬空滴加 10–20 μ l RNase free water（事先在 80–100°C 水浴预热可提高产量），室温放置 1 min，13,000 rpm 离心 1 min 得到 RNA 溶液。
▲ 减少洗脱液体积可以提高 RNA 浓度，但是最低洗脱液体积不应少于 6 μ l。

附录 1：DNA 酶柱上消化（详细请参考 RN34 DNase I 柱上消化试剂盒说明书）

1. 按照前面所列 RN56 试剂盒操作步骤操作，直到做完样品纯化的操作步骤 2。
2. 取 20 μ l DNase buffer 和 2 μ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液（处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液）。
▲ DNase Buffer 含 Mn²⁺，可能有轻度发黄发黑，甚至黑色沉淀为正常现象，颠倒混匀后正常使用即可。
3. 向离心柱中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1，13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
4. 向离心柱的膜中央加入前面准备的 22 μ l 的 DNase I 工作液，室温（20°C–30°C）放置 15 min。注意直接将工作液滴在膜中央上充分浸润膜，不要让工作液滴在离心柱管壁上挂壁不能充分和膜接触。
5. 向离心柱中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1，13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液，将离心柱放回收集管中。
6. 接操作步骤（三）样品纯化下面第 4 步，完成后续步骤。