



版本号:190902

## 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	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
PLANTaid	室温	5 ml
DNase Buffer	-20 °C	1.25 ml
RNase free DNase I	-20 °C	100 µl
RNase-free 超微量 RNA 离心柱和收集管	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°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。
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<sup>6</sup> 个）或者组织（< 5mg）。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. 特殊微量 10 $\mu$ g 离心柱设计可以最低 6 $\mu$ l 洗脱，保证了提取 RNA 的高浓度。
3. 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。
4. 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。

## ❖ 注意事项

1. 所有的离心步骤均在室温完成。
2. 部分含糖多酚、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 $\mu$ l）PLANTaid**。
3. 关于DNA酶柱上消化的使用：
  - 1) 普通RT-PCR：可以省略DNA酶柱上消化步骤。
  - 2) 荧光定量RT-qPCR：
    - (A) 可以加上DNA酶柱上消化步骤。下游采用不加基因组清除步骤的反转录试剂盒即可（如科尔普货号：PC58）。
    - (B) 可以省略DNA酶柱上消化步骤。但是下游建议采用带基因组清除的反转录试剂盒即可（如科尔普货号：PC54）。
  - 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。

## ❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

### 提示：

- ⇒ 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 瓶加入指定量无水乙醇！

**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：5mg 以内的组织加 300 $\mu$ l 的裂解液 RLT 后匀浆。

**注：PLANTaid 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富的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 $\mu$ l， $10^6$  细胞以内加 300 $\mu$ 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。

若研磨匀浆后不溶物碎片太多，可将匀浆后裂解物 13,000rpm 离心 1 分钟沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物。将上清液转移到新的 1.5ml 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. 将混合物加入一个微量 RNA 离心柱中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
3. 加 700 $\mu$ l 去蛋白液 RW1，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

4. 加入 500 $\mu$ l 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 500 $\mu$ l 漂洗液 RW，重复一遍。
5. 将离心柱放回空收集管中，12,000 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。
6. 取出离心柱，放入一个干净 1.5ml 离心管中，在吸附膜的中间部位加 15 $\mu$ 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。

**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  $\mu$ 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 $\mu$ l DNase buffer 和 2 $\mu$ 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）。

**注意：DNase Buffer 含 Mn<sup>2+</sup>，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 $\mu$ l 去蛋白液 RW1，12,000 rpm 离心 30 秒，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 $\mu$ l 的 DNase I 工作液，室温（20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C）放置 15 分钟。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 $\mu$ l 去蛋白液 RW1，12,000 rpm 离心 30 秒，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。