



武汉科尔普生物科技有限公司

Keep Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ 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
RN2801	20次
RN2802	50次

❖ 适用范围:

适用于快速提取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PCR, 荧光定量PCR。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	20 次	50 次
裂解液 RLT Plus	室温	20ml	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	15 ml	40 ml
漂洗液 RW	室温	5 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	10ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	10 ml
70%乙醇	室温	4ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前按说明加指定量乙醇	9ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
基因组 DNA 清除柱 和收集管	室温	20 套	50 套
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	20 套	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 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 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. 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, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.1-2.2 (100% 纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右, 很多公司无法达到这个标准, 所以 1.9-2.0 就凑合用了, 但是我

们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2)，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。**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 3×10^6 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。**
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℃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。）
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。
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 5 kb 和 2kb, 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, 否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

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 (10mM Tris, pH7.5) 在 2.1-2.2 之间 (100% 纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右, 很多公司无法达到这个标准, 所以 1.9-2.0 就凑合用了, 但是我们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2)。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品, 假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280 读数 1.8-2.1 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. 组织培养细胞

- a. 收集 $<10^7$ 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 ($<5 \times 10^6$ 细胞) 或 600μl (5×10^6 - 1×10^7 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 $<1 \times 10^5$ 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) 注射器剧烈抽打裂解物 10 次以上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. 立刻接**操作步骤**项下 3。

2. 动物组织（例如鼠肝脑）

- a. **电动匀浆：**新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块,加入 350μl(<20 mg 组织)或者 600μl(20-30mg 组织)的裂解液 RLT Plus 后电动彻底匀浆 20-40 秒。

b. 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 μ l/600 μ l 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) 注射器剧烈抽打裂解物 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. 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)。

d. 立刻接**操作步骤**项下 3。

3. 立刻 13,000 rpm 离心 60 秒, 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. 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (通常为 350 μ l/600 μ l, 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 700 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 30 秒, 弃掉废液。
6. 加 700 μ l 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 500 μ 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 μ 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 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。

-
10. 如果预期 RNA 产量>30 μ g,加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 9, 合并两次洗脱液,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。