

## AipEasy Plus 组织/细胞 RNA 快速大量提取试剂盒(离心柱型) AipEasy Plus Tissue/Cell RNA Rapid Maxi Kit(Centrifugal Column)

## 使用说明书

- ◆目录号: RE242
- ◆试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	10 次(RE242-01)
裂解液 RLT Plus	室温	100mL
去蛋白液 RW1	室温	120mL
漂洗液 RW	室温	25mL* 2 第一次使用前按说明加指定量乙醇
70%乙醇	室温	15mL* 2 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
基因组 DNA 清除柱 和收集管	室温	10 套
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	10 套

- ◆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和荧光定量PCR等下游试验。
- **◆产品储存:** 本试剂盒在室温储存 6 个月不影响使用效果。

#### ◆储存事项:

- 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 AipEasy 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 和荧光定量 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

## i-presci | 爱普科学

## Research use only

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一离心的步骤, 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 Water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

#### ◆产品特点:

- 1. 不需要使用有毒的苯酚、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60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 和荧光定量 PCR 等下游实验。
- 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 1.9~2.0,基本无 DNA 残留,可用于 RT-PCR 和 Northern-blot 等各种实验。

#### ◆注意事项:

- 1. 所有的离心步骤均可在室温完成,使用可容纳 50mL 离心管的离心机。
- 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 100mg 就会超过柱子处理能力。COS 细胞 RNA 含量丰富,超过 6x10<sup>7</sup>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 6x10<sup>7</sup>,组织不超过 200mg。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. 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,本公司的 AipEasy 系列 RNA 提取产品,由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜,在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留(一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见)影响不是很大,如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 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(Clean up),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。

#### 5. 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 5kb 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**  $OD_{260}/OD_{280}$  比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA, $OD_{260}/OD_{280}$  读数(10mMTris,pH7.5)在 1.8-2.1 之间。 $OD_{260}/OD_{280}$  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,pH 7.5 溶液中测出的  $OD_{260}/OD_{280}$  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,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  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  测定,按照以下公式进行 RNA 浓度的计算: 终浓度(ng/uL)=( $OD_{260}$ )×(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!

#### 组织培养细胞

- 1) 收集<2x10<sup>8</sup> 悬浮细胞到一个合适大小离心管,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。
- 2) 10,000-13,000xg 离心 20 秒(或者 300xg 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。
- 3) 轻弹管壁将细胞沉淀完全松散重悬,加 5mL(<108 细胞)或 10mL(1x108-2x108 细胞)裂解液 RLT Plus,吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒充分裂解。</p>
- 4) 匀浆:(处理细胞量极少时<2x10<sup>6</sup>一般不需要,涡旋振荡一分钟匀浆)。用带钝针头的一次性 10mL(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 60 秒),可以剪切 DNA,降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。
- 5) 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)。
- 6) 立刻接操作步骤项下 3。

#### 2. 动物组织(例如鼠肝脑)

1) 电动匀浆: 新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块, 加入 5mL(<250mg 组织)或者

## Research use only

10mL(400-500mg 组织)的裂解液 RLT Plus 后电动彻底匀浆 1 分钟。

- 2) 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(250mg/500mg) 转入装有 5mL/10mL 组织裂解液 RLT Plus 的 50mL 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 10mL(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 60 秒),可以剪切 DNA,降低 粘稠度防堵塞柱子和提高产量。
- 3) 将匀浆后裂解物 10,000-13,000xg 离心 5 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)。
- 4) 立刻接操作步骤项下 3。
- 3. 立刻 10,000-13,000xg 离心 5 分钟, 保留滤过液(RNA 在滤过液中)。
  - 注: 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 5mL/10mL, 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. 将混合物加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中)10,000-13,000xg 离心 3 分 钟(确保全部通过, 膜上无残留液体, 否则应加大转速和时间), 弃掉废液。
- 6. 加 10mL 去蛋白液 RW1, 室温放置 1 分钟, 12,000xg 离心 3 分钟, 弃掉废液。
- 7. 加入 10mL 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 10,000-13,000xg 离心 1-2 分钟,弃掉废液。加入10mL漂洗液RW,重复一遍。
- 8. 将吸附柱 RA 放回空收集管中,13,000xg 离心 5 分钟以干燥膜基质残留乙醇,用枪 头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇,室温或者烘箱晾干几分钟。
- 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 500μL-1mL RNase-free Water, 室温放置 3 分钟, 12,000xg 离心 2 分 钟。
- 10. 如果预期 RNA 产量>0.6mg, 加 300-500μL 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)。

注 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。

\_\_\_\_\_\_

4/5



# Research use only

