AipEasy 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)

AipEasy Tissue/Cell RNA Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

使 用 说 明 书

◆目录号：RE240

目录编号	包装单位
RE240-01	50次

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(RE240-01)
裂解液 RLT	室温	50mL
去蛋白液 RW1	室温	40mL
漂洗液 RW	室温	10mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
70%乙醇	室温	9mL RNase-free Water 第一次使用前按说明加指定量乙醇
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	50 套

◆**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。

◆**产品储存：**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：**独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后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 Water 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 10 分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度，OD_{260}/OD_{280} 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，但是爱普科学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 13,000rpm 的台式离心机即可。
2. 样品处理量绝对不要 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则可能反而造成产量降低。不同组织细胞种类 RNA 相差极大，COS 细胞 RNA 含量丰富，超过 $3x10^6$ 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 RNA 含量时宁可使用较少的样品处理量，如细胞不超过 $3\text{-}4x10^6$，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 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 RNase-free 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
   3) RNA 在裂解液 RLT 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用 RNase-free 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 RNase-free 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 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，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(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(爱普科学 DNA 酶柱上消化试剂盒，货号：RE280)。

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 2kb 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。

纯度：OD_{260}/OD_{280} 比值是衡量蛋白质污染程度的参考指标。高质量的 RNA，OD_{260}/OD_{280} 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，但是爱普科学的产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准)。OD_{260}/OD_{280} 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 OD_{260}/OD_{280} 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 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/μL)=(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！

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(见附录一)反复吹打细胞裂解(裂解后直接接操作步骤项 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 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。

C. 轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加 350μL(<$5x10^6$细胞)或 600μL($5x10^6$-$1x10^7$细胞)裂解液 RLT，用移液器反复吹打充分裂解(直到看不细胞团为止)。

D. 立刻接**操作步骤项下 3**。

2. **动物组织(例如鼠肝脑)**

A1. **匀浆器匀浆：**新鲜组织加入 350μL(<20mg 组织)或者 600μL(20-30mg 组织)的裂解液 RLT 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 350μL/600μL 组织裂解液 RLT 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：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。将上清液转移到新的 1.5mL 离心管内。

B. 立刻接操作步骤项下 3。

3. 较精确估计裂解物(上清)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。
4. 立刻将混合物(每次小于 720μL，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)13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
5. 加 700μL 去蛋白液 RW1，室温放置 30 秒，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
6. 加入 500μL 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!)，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500μL 漂洗液 RW，重复一遍。
7. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000rpm 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。
8. 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 30-50μL RNase-free Water， 室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 1 分钟得到 RNA 溶液。

注：洗脱缓冲液体积不应少于 30 μL，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^2)	加培养液量(mL)	可获细胞量
24 孔培养板	2	1.0	5×10^5

6 孔培养板	9.6	2.5	2.5×10^6
3.5cm 培养皿	8	3.0	2.0×10^6
6cm 培养皿	21	5.0	5.2×10^6
25cm 塑料培养瓶	25	5.0	5.2×10^6
100mL 玻璃培养瓶	33	10.0	7×10^6

注： 一般情况下，3.5cm直径培养皿或者更小培养容器加350μL裂解液RLT，6cm直径培养皿或者更大培养容器加600μL裂解液RLT。最大处理量不超过10^7个细胞。

==========

扫码关注我们