

AipPure Plus 通用型总 RNA 极速提取试剂盒(离心柱型)

AipPure Plus Universal Total RNA Ultra-Rapid Mini Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

- ◆版本号：260110
- ◆目录号：RE246
- ◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次 (RE246-01)	200 次 (RE246-02)
裂解液 RF	室温	30mL	120mL
去蛋白液 RW1	室温	35mL	140mL
漂洗液 RW	室温	10mL	40mL
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free Water	室温	5mL	20mL
基因组 DNA 清除柱 和收集管(2mL)	室温	50 套	200 套
RNA 吸附柱 RA 和收集管(2mL)	室温	50 套	200 套

- ◆适用范围：适用于极速提取培养细胞、动物组织和普通植物等样品中的总 RNA。
- ◆产品储存：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。常温组分储存于低温(4°C 或 -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(15-25°C)进行。
- ◆产品介绍：

本试剂盒为 6 分钟内即可超快速完成整个 RNA 提取的专用试剂盒，无需使用酚/氯仿、β-巯基乙醇等有毒有害试剂，适用于培养细胞、动物组织和普通植物等样品中提取总 RNA。

本试剂盒采用爱普科学独特的升级版裂解液，可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 被清除的同时，而 RNA 被有效穿透滤过，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上，再通过一系列快速的漂洗/离心等步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物和蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free Water 将纯净的 RNA 从硅基质膜上洗脱。得到的高纯度 RNA 可直接用于 RT-PCR、荧光定量 PCR、cDNA 合成和 Northern-Blot 等下游相关分子生物学实验。

◆产品特点：

1. 完全不使用有毒的苯酚、氯仿和 β-巯基乙醇等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。

2. 操作简单，快速便捷，整个提取过程操作一般可在 6 分钟内完成，是目前国际上提取速度最快、操作步骤最少和提取质量最佳的总 RNA 提取方法。
3. 爱普科学独家研发的基因组 DNA 清除柱技术确保高效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 适用广泛，通用性强，可适用于培养细胞、动物组织和普通植物等样本的总 RNA 提取。
5. 多次柱漂洗确保高纯度，得到的 RNA 纯度高、完整性好，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值可达 2.1-2.2(100%纯的 RNA 比值一般在 2.2 左右，很多公司的产品因为残留蛋白或 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 12,000rpm 的传统台式离心机。
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。
3. 样品处理量绝对不要超过微量 RNA 吸附柱的处理能力，否则造成 DNA 残留或者产量降低。
4. 裂解液 RF 和去蛋白液 RW1 中含有盐酸胍/异硫氰酸胍化合物，操作时请穿实验服并佩戴一次性乳胶手套，实验操作中应避免避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或者生理盐水冲洗。
5. 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°C 烘烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5M 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°C 放置过夜，高压灭菌)
6. 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 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和特殊吸附能力的吸附膜，已经清除了绝大部分的 DNA 残留，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。或者选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。或者缩短延伸时间，使 DNA 来源模板无法参与扩增反应。
 - 2) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理：在操作步骤的去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在微量 RNA 吸附柱上进行 DNase I 柱上消化处理，以进一步清除 gDNA 残留污染。可购买爱普科学的 DNA 酶柱上消化试剂盒(货号：RE180)，购买前可先索取具体操作说明书。
 - 3) 本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁纯化(货号：RE182)，请联系我们索取具体操作说明书。
7. **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：OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值是衡量蛋白质污染程度的重要参考指标。高质量 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数在 2.1-2.2 之间(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，但是爱普科学的试剂盒提取产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准)。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度(ng/uL)=(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 瓶中按照该组分标签上的指示，加入指定量无水乙醇，充分混匀后请及时在标签上标记已加入乙醇，以免多次加入！

1. 样本处理

<p>动物组织</p>	<p>取新鲜组织约 10-20mg(<30mg)加入 500uL 裂解液 RF, 用玻璃匀浆器或电动匀浆器将组织研磨均匀。若用液氮研磨, 在液氮中研磨组织成粉末后, 取适量组织细粉 10-20mg(<30mg)转移至预装有 500uL 裂解液 RF 的 1.5mL 离心管, 涡旋震荡或移液器吹打直至无明显细胞团即可, 立即进行后续操作。</p>
<p>贴壁细胞</p>	<p>无需消化, 吸除细胞培养基上清后可直接在培养皿中立即加入 500uL 裂解液 RF 消化裂解(可用移液器反复吹打帮助裂解); 不方便直接裂解的培养容器, 可以用细胞刮子刮下细胞, 或者胰酶消化后离心收集细胞, 吸弃上清, 加入 500uL 裂解液 RF(<8*10⁶ 个细胞), 涡旋震荡或移液器吹打直至无明显细胞团即可, 立即进行后续操作。</p>
<p>悬浮细胞</p>	<p>直接离心收集细胞, 12,000rpm 离心 10 sec, 使细胞沉淀下来, 吸弃上清后加入 500uL 裂解液 RF(<8*10⁶ 个细胞), 涡旋震荡或移液器吹打直至无明显细胞团即可, 立即进行后续操作。</p>
<p>普通植物</p>	<p>液氮中研磨适量植物/真菌组织成细粉后, 取 50-100mg 细粉转移至预装有 600uL 裂解液 RF 的 1.5mL 离心管中, 立即剧烈涡旋震荡 30 sec, 使样本与裂解液充分混合裂解完全, 12,000rpm 离心 5 min, 立即进行后续操作。</p>

2. 将处理好的匀浆液加入到基因组DNA清除柱中(吸附柱已放入收集管中), 12,000rpm 离心30 sec, 弃掉通用柱, 保留收集管中的滤液(RNA在滤液中)。
3. 向滤液中加入0.5倍滤液体积的无水乙醇(约250uL), 移液器充分吹打混匀。
注 若加乙醇后出现浑浊或有絮状物产生, 属正常现象, 立即吹打混匀, 不要离心。
4. 将上述混合液加入至一个新的吸附柱RA中(吸附柱已放入收集管中), 12,000rpm 离心30 sec, 弃滤液。将吸附柱RA重新放回收集管中。
注: 吸附柱容积为750uL, 若混合液超过该体积请分多次进行上柱。
5. 向吸附柱RA中加入700uL去蛋白液RW1, 12,000rpm 离心15 sec, 弃滤液。
6. 向吸附柱RA中加入500uL漂洗液RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心15 sec, 弃滤液。
7. 向吸附柱RA中加入500uL漂洗液RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心2 min。小心将吸附柱RA从收集管中取出, 避免吸附柱RA下沿接触滤液, 导致污染。
注: (可选)若吸附柱RA有液体残留或接触到滤液, 弃滤液, 将吸附柱RA重新放回收集管中, 12,000rpm 离心空甩1 min, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
8. 取出吸附柱RA, 放入一个新的RNase-free离心管中, 根据预期RNA产量在吸附膜的中间部位加入30-50uL RNase-free Water(事先在70-90°C水浴中加热可提高产量), 室温放置1 min, 12,000rpm 离心1 min, 洗脱RNA。提取的高纯度RNA可直接用于下游相关实验或储存于-85°C至-65°C保存。

注：可重新加入30-50uL RNase-free Water重复操作步骤8一遍，合并两次洗脱液(如果需要RNA产量高)；或者使用第一次的洗脱液重新加回到微量RNA吸附柱内，重新洗脱一遍(如果需要RNA浓度高)。用户根据具体实验需要自行选择。

注：洗脱体积越大，洗脱效率越高，RNA产量越高，但是浓度将会降低。如果需要RNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小洗脱体积建议最好不少于25uL，体积过小会降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。

=====

