



## 产品信息:

试剂盒组成	保存	RA105-01 50 次
裂解液 RLT	室温	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前加入 40 ml 无水乙醇
DNase I	-20℃	500 μl
缓冲液 RDD	-20℃	1 ml×4
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	10 ml
70%乙醇	室温	9 ml RNase-free H <sub>2</sub> O 第一次使用前加入 21 ml 无水乙醇
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个
收集管	室温	50 个
RNase-free 离心管 1.5 ml	室温	50 个

**保存条件:** 本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

## 产品介绍:

独特的裂解液/ $\beta$ -巯基乙醇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 在高离子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 H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

**自备试剂:** 乙醇,  $\beta$ -巯基乙醇

## 注意事项:

- 需要自备一次性注射器, 研钵。裂解液RLT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。
- 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 EASYspin 系列 RNA 提取产品，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。

### 操作步骤：

#### 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!
- ⇒ 操作前在裂解液 RLT 中加入 $\beta$ -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml RLT 中加入 10  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT 4℃可放置一个月。

#### 1. 组织培养细胞

- a. 收集 $<10^7$  悬浮细胞到一个 1.5 ml 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. 12,000 rpm 离心 10 sec（或者 300 $\times$ g 离心 5 min），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**，加入 350  $\mu$ l ( $<5\times 10^6$  细胞) 或者 600  $\mu$ l ( $5\times 10^6$ - $1\times 10^7$  细胞) 裂解液 RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 sec，充分裂解。
- d. 用带钝针头的一次性 1 ml(配 0.9 mm 针头) 注射器抽打裂解物 5-10 次或直到得到满意匀浆结果（或者电动匀浆 30 sec），可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- e. 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 350  $\mu$ l( $<20$  mg 组织)或者 600  $\mu$ l(20-30 mg 组织)的裂解液 RLT 后电动彻底匀浆 20-40 sec。
- 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(20 mg/30 mg)转入装有 350  $\mu$ l/600  $\mu$ l 组织裂解液 RLT 的 1.5 ml 离心管中，用手剧烈振荡 20 sec，充分裂解。用带钝针头的一次性 1 ml(配 0.9 mm 针头) 注射器抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果（或者电动匀浆 30 sec），可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- c. 将匀浆后裂解物 12,000 rpm 离心 3 min，沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物，将裂解物上清小心转到一个新离心管。
- d. 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。

- 立刻将混合物 (每次小于 700  $\mu$ 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), 12,000 rpm 离心 60 sec, 弃掉废液。
- 加 350  $\mu$ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 sec, 12,000 rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。将吸附柱 RA 放回收集管中。
- DNase I 工作液的配制: 取 10  $\mu$ l DNase I 储存液放入新的 RNase-free 离心管中, 加入 70  $\mu$ l RDD 溶液, 轻柔混匀。
- 向吸附柱 RA 中央加入 80  $\mu$ l DNase I 工作液, 室温放置 15 min (一般情况下室温放置可得到较好的消化效果, 如果室温效果不佳可选择在 37 $^{\circ}$ C 放置 15 min)。
- 加 350  $\mu$ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 sec, 12,000 rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。将吸附柱 RA 放回收集管中。
- 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 sec, 弃掉废液。加入 500  $\mu$ l 漂洗液 RW, 重复一遍。
- 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 将吸附柱置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
- 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  $\mu$ l RNase free H<sub>2</sub>O (事先在 65 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min。

对于 RNA 含量少 ( $\leq 5 \mu$ g) 的样品, 可以选择购买本公司微量 RNA 吸附柱 (货号: QA3101), 此吸附柱最小洗脱体积为 5  $\mu$ l, 可提高 RNA 的洗脱浓度, 帮助后续实验的进行。

BM190625