

# EASYspin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

EASYspin RNA Rapid Tissue and cell Kit



## 产品信息:

试剂盒组成	保存	RA105-01 50 次
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
DNaseI	-20℃	500µl
缓冲液 RDD	-20℃	1ml×4
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	10ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H <sub>2</sub> O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个
收集管	室温	50 个
RNase-free 离心管 1.5ml	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/β-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 H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

**自备试剂:** 乙醇, β-巯基乙醇

## 注意事项:

- 1.需要自备一次性注射器，研钵。RA105 EASYspin 组织 细胞RNA快速提取试剂盒-MBI.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。

### 3.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 $^{\circ}$ C 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 1.5ml 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.12,000rpm 离心 10 sec (或者 300g 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 1ml(配 0.9mm 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(20-30mg 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(20mg/30mg)转入装有 350 $\mu$ l/600 $\mu$ l 组织裂解液 RLT 的 1.5ml 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 0.9mm 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 12,000rpm 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。
- 4.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) 12,000rpm 离心 60 sec, 弃掉废液。
- 5.加 350 $\mu$ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 sec, 12,000rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。将吸附柱 RA 放回收集管中。
- 6.DNaseI 工作液的配制: 取 10 $\mu$ l DNaseI 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。
- 7.向吸附柱 RA 中央加入 80 $\mu$ l DNaseI 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)。
- 8.加 350 $\mu$ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 sec, 12, 000rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。将吸附柱 RA 放回收集管中。
- 9.加入 500 $\mu$ l 漂洗液 RW (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。加入 500 $\mu$ l 漂洗液 RW,重复一遍。
- 10.将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000rpm 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。
- 11.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 water(事先在 65 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 1 min, 12,000rpm 离心 1 min。