

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 20 次	RA105-01 50 次
裂解液 RLT	室温	20 ml	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	15 ml	40 ml
		5 ml	10 ml
漂洗液 RW	室温	第一次使用前加入 20 ml 无水乙醇	第一次使用前加入 40 ml 无水乙醇
DNase I-XT	-20℃	200 µl	500 µl
缓冲液 RDD	-20℃	1 ml×2	1 ml×4
H ₂ O(RNase-free)	室温	10 ml	10 ml
		3.6 ml H ₂ O(RNase-free)	9 ml H ₂ O(RNase-free)
70%乙醇	室温	第一次使用前加入 8.4 ml 无水乙醇	第一次使用前加入 21 ml 无水乙醇
RNase-free 吸附柱 RA	室温	20 个	50 个
收集管	室温	20 个	50 个
RNase-free 离心管 1.5 ml	室温	20 个	50 个

保存条件： 本试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果。

产品介绍：

独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，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，通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的 H₂O(RNase free) 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

自备试剂： 乙醇

注意事项：

1.需要自备研钵。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。

2. 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！

1. 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 μ l ($<5\times 10^6$ 细胞) 或者 600 μ l (5×10^6 - 1×10^7 细胞) 裂解液 RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 sec 或涡旋振荡至无明显细胞团块，充分裂解。
- d. 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 μ l (<20 mg 组织) 或者 600 μ 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 μ l/600 μ l 组织裂解液 RLT 的 1.5 ml 离心管中，用手剧烈振荡 20 sec 或涡旋振荡至无明显粉末团块，充分裂解。
- 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。

- 4.立刻将混合物（每次小于 700 μ 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。
- 5.加 350 μ 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。
- 6.DNase I-XT 工作液的配制：取 10 μ l DNase I-XT 储存液放入新的 RNase-free 离心管中，加入 70 μ l RDD 溶液，轻柔混匀。
- 7.向吸附柱 RA 中央加入 80 μ l DNase I 工作液，室温放置 5 min。
- 8.加 350 μ 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。
- 9.加入 500 μ 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 μ l 漂洗液 RW，重复一遍。
- 10.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。
- 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 μ l H₂O(RNase free)（事先在 65℃ 水浴中加热效果更好），室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min。