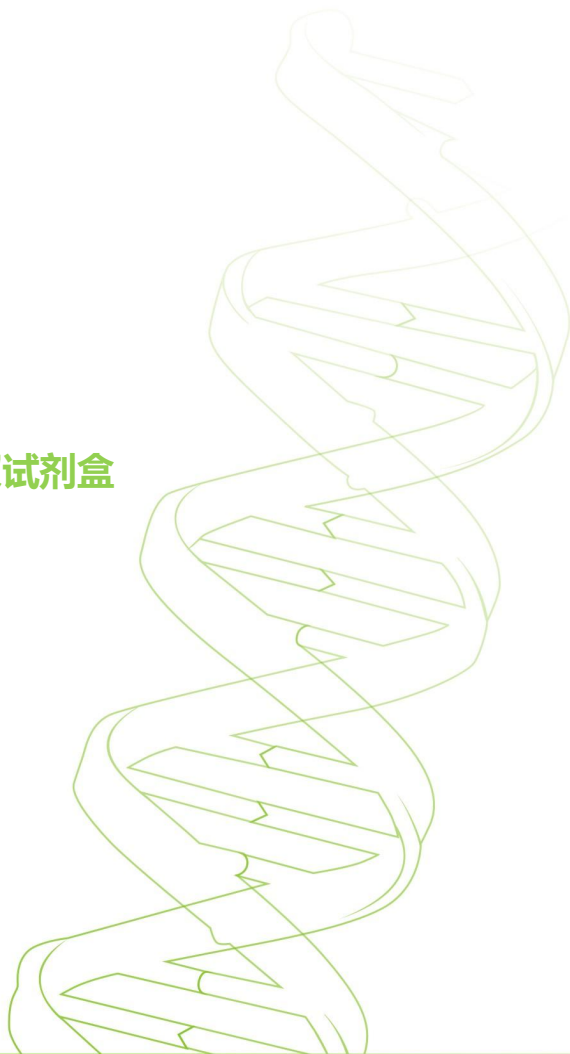


Imagene[®]

组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

目录号 RE129

使用说明书

网站: www.codonx.com

咨询电话: 010-56315162

技术支持 QQ: 3090544158

1/产品内容

2/储存事项

3/产品介绍

4/产品特点

5/注意事项

6/操作步骤

1/产品内容:

试剂盒组成	20 次(RE129-01)	50 次(RE129-02)
裂解液 LBT Plus	20 ml	50 ml
去蛋白液 PRS	15 ml	40 ml
漂洗液 RB	5ml <i>第一次使用前按说明加 指定量乙醇</i>	10ml <i>第一次使用前按说明加 指定量乙醇</i>
RNase-free H ₂ O	10 ml	10 ml
70%乙醇	4ml RNase-free H ₂ O <i>第一次使用前按说明加 指定量乙醇</i>	9ml RNase-free H ₂ O <i>第一次使用前按说明加 指定量乙醇</i>
基因组 DNA 清除柱 CC 和收集管 CT	20 套	50 套
RNase-free 吸附柱 AC 和收集管 CT	20 套	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

2/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°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
- ② 不合适的储存于低温（4°C 或者 -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°C - 25°C）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。

3/产品介绍:

本产品在推出无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，又研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液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 被清除而 RNA 穿透滤过。滤过的 RNA 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 H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

4/产品特点：

- ① 完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
- ② 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
- ③ 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
- ④ 多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 2.1-2.2（100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右，很多公司无法达到这个标准，所以 1.9-2.0 就可以用了，但是我们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2），基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

5/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13,000 rpm的传统台式离心机。
2. 样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱DA和和RNA吸附柱RA处理能力，否则造成DNA残留或者产量降低。不同组织细胞种类RNA/DNA相差极大，例如胸腺脾脏DNA含量丰富，超过5mg就会超过柱子处理能力。COS细胞RNA含量丰富，超过3x10⁶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DNA/RNA含量时宁可使用较少的样品处理量，如细胞不超过3-4x10⁶，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LBT Plus 和去蛋白液PRS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。
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) 使用无RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - 3) RNA 在裂解液LBT Plus 中时不会被RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase 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) 配制溶液应使用无 RNase 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。)

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 GenePure Plus RNA 提取产品, 由于采取了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。
- 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(cleanup),请联系我们索取具体操作说明书。
- 4) 在步骤去蛋白液 PRS 漂洗前,直接在吸附柱 AC 上进行 DNase I 处理。购买 DNA 酶柱上消化试剂盒 (RE128), 请联系我们索取具体操作说明书。

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 5 kb 和 2kb, 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, 否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度: OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的参考指标。高质量的 RNA, OD260/OD280 读数 (10mM Tris, pH7.5) 在 2.1-2.2 之间 (100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右, 很多公司无法达到这个标准, 所以 1.9-2.0 就凑合用了, 但是我们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2)。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品, 假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280

读数 1.8-2.1 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, OD280 测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：
终浓度 (ng/μl) = (OD260)×(稀释倍数n)×40。

6/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. 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. 13, 000rpm 离心 10 秒（或者 300g 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. 轻弹管壁将细胞沉淀**完全松散重悬**，加 350μl ($<5 \times 10^6$ 细胞) 或 600μl (5×10^6 - 1×10^7 细胞) 裂解液 LBT Plus，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒充分裂解。
- d. 匀浆：（处理细胞量极少时 $<1 \times 10^5$ 一般不需要，涡旋振荡一分钟匀浆）。用带钝针头的一次性 1 ml(配 0.9mm 针头) 注射器剧烈抽打裂解物 10 次以上或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。
- e. 将裂解混合物或匀浆混合物全部加到 DNA 清除柱上(清除柱放在收集管内)。
- f. 立刻接**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 350μl(<20 mg 组织)或者 600μl(20-30mg 组织)的裂解液 LBT Plus 后电动彻底匀浆 20-40 秒。
- 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 350μl/600μl 组织裂解液 LBT Plus 的 1.5ml 离心管中，用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。用带钝针头的一次性 1 ml(配 0.9mm 针头) 注射器剧烈抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低

粘稠度防堵塞柱子和提高产量。

c. 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, 将裂解物上清全部加到 DNA 清除柱上(清除柱放在收集管内)。

d. 立刻接**操作步骤**项下 3。

3. 立刻 13,000 rpm 离心 60 秒, 保留滤过液(RNA 在滤过液中)。

确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积(通常为 350 μ l/600 μ l, 滤过时候损失体积应该减去),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。

5. 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) 13,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。

6. 加 700 μ l 去蛋白液 PRS, 室温放置 1 分钟, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。

7. 加入 500 μ l 漂洗液 RB(**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 13,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RB,重复一遍。

8. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 13,000 rpm 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。

9. 取出吸附柱 AC, 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 RNase free water(事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量), 室温放置 1 分钟, 13,000 rpm 离心 1 分钟得到 RNA 溶液。**洗脱缓冲液体积不应少于 30 μ l**, 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。**



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com