

组织/细胞 RNA 提取试剂盒

KR018 50次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次
裂解液 RLT Plus	室温	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
基因组 DNA 清除柱和收集管	室温	50 套
RNase-free H ₂ O	室温	10ml
RNase-free	室温	50 套
吸附柱 RA 和收集管		

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 环境温度低时溶液可能形成沉淀, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 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。

产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚, 氯仿, Beta 巯基乙醇等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速, 简捷, 单个细胞样品操作一般可在 15 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, 可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 提取 RNA 可以达到高水准的 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13,000 rpm的台式离心机即可。
2. **样品处理量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 3×10^6 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 $3-4 \times 10^6$, 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RLT Plus 和去蛋白液RW1中含有盐酸胍/异硫氰酸胍化合物, 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RLT 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°C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, 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, 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。
- 4) 去蛋白液 RW1 漂洗前, 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。

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 2 kb 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参考指标。高质量的 RNA, OD260/OD280 读数在 2.1-2.2 之间 100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右 (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。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, 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 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇!

1. 培养细胞

A1. 贴壁细胞: 不需消化, 彻底吸干净培养液体后直接加推荐量裂解液 RLT Plus (见附录一) 反复吹打细胞裂解, 取裂解后的匀浆液全部加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内) 直接接**操作步骤 3**; 不方便直接裂解的培养容器, 可以用细胞刮子刮下细胞, 或者胰蛋白酶消化后吹打下来收集细胞到 1.5ml 离心管。

A2. 悬浮细胞: 收集 $<10^7$ 悬浮细胞到一个 1.5ml 离心管。

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. 轻弹离心管底部, 使细胞沉淀松散, 加 350 μ l ($<5 \times 10^6$ 细胞) 或 600 μ l (5×10^6 - 1×10^7 细胞) 裂解液 RLT Plus, 用移液器反复吹打充分裂解 (直到看不细胞团为止)。

D. 将裂解混合物全部加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内)。

E. 立刻接**操作步骤 3**。

2. 动物组织 (例如鼠肝脑)

A1. 匀浆器匀浆: 新鲜组织加入 350 μ l (<20 mg 组织) 或者 600 μ l (20-30mg 组织) 的裂解液 RLT Plus 后玻璃匀浆器或电动匀浆器将组织彻底研磨匀浆。

A2. 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 μ l/600 μ l 组织裂解液 RLT Plus 的 1.5ml 离心管中, 剧烈振荡 20 秒, 难裂解样品可用移液器反复吹打匀浆。

注意: 若研磨匀浆后不溶物碎片太多, 可将匀浆后裂解物 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。将上清液加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内)。

B. 将研磨均匀的匀浆液全部加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内)。

C. 立刻接**操作步骤 3**。

3. 立刻 13,000 rpm 离心 1 分钟, 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. 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, 可用移液器吸取滤液估计

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 720 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。
- 加 700 μ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 秒, 13, 000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
- 加入 500 μ l 漂洗液 RW (**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 RW, 重复一遍。
- 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 除去漂洗液中的乙醇。
- 取出吸附柱 RA, 放入一个干净 1.5ml 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, 室温放置 1 分钟, 1,3,000 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。

附录一: 贴壁培养细胞数量表

培养器皿	底面积 (cm ²)	加培养液量 (ml)	可获细胞量
24 孔培养板	2	1.0	5 \times 10 ⁵
6 孔培养板	9.6	2.5	2.5 \times 10 ⁶
3.5cm 培养皿	8	3.0	2.0 \times 10 ⁶
6cm 培养皿	21	5.0	5.2 \times 10 ⁶
25cm 塑料培养瓶	25	5.0	5.2 \times 10 ⁶
100ml 玻璃培养瓶	33	10.0	7 \times 10 ⁶

注: 一般情况下, 3.5cm 直径培养皿或者更小培养容器加 350 μ l 裂解液 RLT Plus, 6cm 直径培养皿或者更大培养容器加 600 μ l 裂解液 RLT Plus。最大处理量不超过 10⁷ 个细胞。