

版本号: DP250304

RNA Easy Fast Tissue/Cell Kit

RNA Easy Fast 动物组织/细胞总RNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP451

产品内容

产品组成	DP451 (50 preps)
裂解液RLA (Buffer RLA)	30 ml
去蛋白液RW3 (Buffer RW3)	40 ml
漂洗液RW (Buffer RW)	12 ml
蛋白酶K (Proteinase K)	500 μ l
无RNA酶双蒸水 (RNase-Free ddH ₂ O)	15 ml
基因组DNA去除柱 (含2 ml收集管) (gDNA Eraser Columns set)	50 套
RNase-Free吸附柱CR4 (含2 ml收集管) (RNase-Free Columns CR4 set)	50 套
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml))	50 个

选配试剂

DNase I (1500 U) (TIANGEN, 目录号: RT411)

储存条件

试剂盒在室温 (15-30℃) 保存, 可保存15个月。选配的RNase-Free DNase I请置于2-8℃保存, 可保存15个月。

产品简介

本产品是基于天根研发的基因组DNA去除技术而开发的动物组织RNA快速提取试剂盒，不用 β -巯基乙醇或DTT等有毒试剂，30 min之内就可完成RNA的提取，可同时处理大量不同样品。本产品提取的总RNA得率高、纯度好、基本没有蛋白和其它杂质的污染，可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA筛选、体外翻译、RNase保护分析和分子克隆等多种下游实验。

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. 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 h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用RNase-Free ddH₂O（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1% (V/V)，混匀后放置过夜，高压灭菌）。

使用注意事项

1. 若后续实验对RNA纯度要求比较严格，可以选择性的进行DNase I消化，参见步骤6，DNase I需自行购买，具体型号参见选配试剂。
2. 第一次使用前应在漂洗液 RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
3. 以下操作如非指明，均在室温下进行。
4. 不建议将样本保存在裂解液中。

操作步骤

一. 从动物组织中提取总RNA

1. 样本前处理

每10-20 mg组织加350 μ l裂解液RLA，用电动匀浆器将组织彻底匀浆，然后加入10 μ l蛋白酶K，混匀后室温放置5 min。

注意：脾脏组织建议使用5 mg，肌肉类的组织可以增加至50 mg-100 mg。

2. 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心2-5 min，取上清进行以下操作。
3. 将得到的上清加入基因组DNA去除柱中，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心30 sec，保留滤液。
4. 向上述滤液中缓慢加入1倍上清体积的70%乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和沉淀一起转入RNase-Free吸附柱CR4中（吸附柱放在收集管中），12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心30 sec，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
5. 如果不进行DNase I消化，向RNase-Free吸附柱CR4中加入700 μ l去蛋白液RW3，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. DNase I 消化（可选）：若后续实验对RNA纯度要求比较严格，可以选择性的进行DNase I 消化。
 - 1) 向RNase-Free吸附柱CR4中加入350 μ l去蛋白液RW3，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
 - 2) DNase I反应液的配制：

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550 μ l RNase-Free ddH₂O中，轻柔混匀，分装后-30~-15 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。

注意：从-30~-15 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于2-8 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。
 - 3) 取10 μ l DNase I 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。
 - 4) 向RNase-Free吸附柱CR4中央加入80 μ l的DNase I 工作液，室温放置15 min。
 - 5) 向RNase-Free吸附柱CR4中加入350 μ l去蛋白液RW3，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
7. 向RNase-Free吸附柱CR4中加入500 μ l漂洗液RW（使用前请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管

中。

8. 重复步骤7。

9. 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心2 min, 倒掉废液。将RNase-Free吸附柱CR4置于室温放置2 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意: 此步骤目的是将RNase-Free吸附柱CR4中残余的漂洗液去除, 漂洗液的残留, 可能会影响后续的RT等实验。

10. 将RNase-Free吸附柱CR4转入一个新的RNase-Free离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100 μl RNase-Free ddH₂O, 室温放置2 min, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心2 min, 得到RNA溶液。

注意: 洗脱缓冲液体积不应少于30 μl , 体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70°C保存。

二. 从细胞中提取总RNA

1. 收集细胞

- a. 悬浮细胞的收集 (收集细胞数量请不要超过 1×10^7) : 估计细胞数量, 300 $\times g$ 离心5 min, 将细胞收集到离心管中, 仔细吸除所有培养基上清。
- b. 单层贴壁细胞的收集 (收集细胞数量请不要超过 1×10^7) : 可直接在培养容器中裂解 (容器直径不超过10 cm), 或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀 (在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法)。

1) 直接裂解法: 确定细胞数量, 彻底吸除细胞培养基上清, 立即进行第2步裂解步骤。

2) 胰蛋白酶处理法: 确定细胞数量, 吸除培养基, 用PBS洗涤细胞, 吸除PBS, 向细胞中加入含有0.10-0.25%胰蛋白酶的PBS处理细胞, 当细胞脱离容器壁时, 加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶, 将细胞溶液转移至RNase-Free的离心管中, 300 $\times g$ 离心5 min, 收集细胞沉淀, 仔细吸除所有上清。

注意: 收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净, 否则会导致裂解不完全, 影响RNA与吸附柱的结合, 造成RNA的产量降低。

2. 裂解处理

对于离心得到的细胞沉淀: 轻弹离心管底部, 使细胞沉淀松散, 加入适量裂解液RLA (用

量详见下表) 和10 μ l蛋白酶K, 涡旋震荡。

沉淀细胞数量	裂解液RLA (μ l)
$<5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

对于直接裂解的细胞: 裂解液RLA使用量详见下表, 将细胞裂解液转移至离心管中, 涡旋震荡混匀。

容器直径 (cm)	裂解液RLA (μ l)
<6	350
6-10	600

- 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心2-5 min, 取上清进行以下操作。
- 将得到的上清加入基因组DNA去除柱中, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心30 sec, 保留滤液。
- 向上述滤液中缓慢加入1倍上清体积的70%乙醇, 混匀(此时可能会出现沉淀), 得到的溶液和沉淀一起转入RNase-Free吸附柱CR4中(吸附柱放在收集管中), 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心30 sec, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。
- 如果不进行DNase I消化, 向RNase-Free吸附柱CR4中加入700 μ l去蛋白液RW3, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心30 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
- DNase I 消化(可选): 若后续实验对RNA纯度要求比较严格, 可以选择性的进行DNase I 消化。
 - 向RNase-Free吸附柱CR4中加入350 μ l去蛋白液RW3, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心30 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
 - DNase I反应液的配制:
将DNase I干粉(1500 U)溶解在550 μ l RNase-Free ddH₂O中, 轻柔混匀, 分装后-30~-15 $^{\circ}$ C贮存(可保存9个月)。
注意: 从-30~-15 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于2-8 $^{\circ}$ C(可保存6周), 不要再次冻存。
 - 取10 μ l DNase I 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。
 - 向RNase-Free吸附柱CR4中央加入80 μ l的DNase I 工作液, 室温放置15 min。

- 5) 向RNase-Free吸附柱CR4中加入350 μ l去蛋白液RW3, 12,000 rpm ($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心30 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
8. 向RNase-Free吸附柱CR4中加入500 μ l漂洗液RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 室温静置2 min, 12,000 rpm ($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心30-60 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
9. 重复步骤8。
10. 12,000 rpm ($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心2 min, 倒掉废液。将RNase-Free吸附柱CR4置于室温放置2 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
- 注意: 此步骤目的是将RNase-Free吸附柱CR4中残余的漂洗液去除, 漂洗液的残留, 可能会影响后续的RT等实验。**
11. 将RNase-Free吸附柱CR4转入一个新的RNase-Free离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100 μ l RNase-Free ddH₂O, 室温放置2 min, 12,000 rpm ($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心2 min, 得到RNA溶液。
- 注意: 洗脱缓冲液体积不应少于30 μ l, 体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70 $^{\circ}$ C保存。**

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 $\times$ TBE电泳缓冲液; 150 V, 15 min) 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。28S rRNA的量约为18S rRNA的两倍, 说明RNA的完整性较好。

纯度: OD₂₆₀/OD₂₈₀比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀读数在1.8-2.1之间, 比值为2.0是高质量RNA的标志。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10 mM 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 ddH₂O稀释n倍, 用RNase-Free ddH₂O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:

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times (\text{稀释倍数}n) \times 40$$





TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品