版本号：250326

EASYspin Tissue & Cell RNA Kit

EASYspin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

目录号：RN07

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(RN0701)
裂解液 RLT	室温	30 ml
去蛋白液 RW1	室温	35 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇
RNase-free H_2O	室温	5 ml
RNA 吸附柱和收集管	室温	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项：

1. 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进行。

2. 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。

产品更新提醒：旧版操作步骤中加入等体积 70%乙醇，改成加入 0.5 倍体积无水乙醇。因此试剂盒不再需要 70%乙醇瓶子这个组分了。

❖ 产品介绍：

本品采用独有的 RNA 吸附柱技术配合新型溶液体系，无需使用酚/氯仿、β-巯基乙醇等有毒有害试剂。适用于从多种新鲜或冻存的动物组织或细胞中高效提取高纯度、高质量的总 RNA，全程最快仅需 8 分钟。

❖ 产品特点：

1. 无需有毒的苯酚/氯仿、β-巯基乙醇等试剂，也无需进行乙醇沉淀等步骤。
2. 快速，简捷，单个细胞样品操作一般可在 8 分钟内完成。
3. RNA 完整性极好不降解 ，电泳图 28S:18S 典型比值大于 2:1 。

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，很多公司的产品因为残留蛋白或 DNA 较多，造成比值降低，无法达到 2.2 这个纯度标准，因此降低要求 1.9−2.0 就凑合使用了，但是艾德莱的产品标准一般可以达到高水准的 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的传统台式离心机。
2. 裂解液RLT和去蛋白液RW1中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，**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. **样品处理量不要超过RNA吸附柱的处理能力，否则反而可能造成产量降低。**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5 mg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3−4×10^6，组织不超过10 mg。将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。**
4. 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EASYspin RNA提取产品，由于采取了本公司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，我们建议在进行模板和引物的选择时：

   ▲选用跨内含子引物，以穿过mRNA中的连接，这样DNA就不能作为模板参与扩增反应。

   ▲选择基因组DNA和cDNA上扩增的产物大小不一样的引物对。

   ▲将RNA提取物用RNase-free的DNase I (货号：RN45)处理以提高效果。本试剂盒还可以用于DNase I处理后的RNA清洁纯化，请联系我们索取具体操作说明书。

   ▲在步骤去蛋白液RW1漂洗前，直接在吸附柱RA上进行DNase I处理。请联系我

们索取具体操作说明书（艾德莱DNase I柱上消化试剂盒货号：RN34）。

5. 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，因此降低要求1.9-2.0就凑合使用了，但是艾德莱的产品标准一般可以达到高水准的2.1-2.2的纯度标准）。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。

浓度：取一定量的 RNA 提取物，用RNase-free ddH_2O稀释n倍，用RNase-free ddH_2O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。

❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

⇨ 第一次使用前请先按漂洗液 RW 瓶标签指示加入无水乙醇!充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入!

一、样本处理

A. 贴壁细胞：无需消化，吸除细胞培养基上清后可直接在培养皿中立即加入 500 μl 裂解液 RLT 消化裂解（可用移液器反复吹打帮助裂解）；不方便直接裂解的培养容器，可以用细胞刮子刮下细胞，或者胰酶消化后离心收集细胞，去上清，细胞沉淀中加入 500 μl 裂解液 RLT（< 8×10^6 个细胞），涡旋震荡或移液器吹打直至无明显细胞团即可。

▲贴壁培养细胞往往不能完全从培养瓶（皿）脱落，这并不意味着裂解不完全，此时细胞膜实际已经完全破裂开，并已释放出全部 RNA，继续做即可。

B. 悬浮细胞：直接离心收集细胞，13, 000 rpm 离心 10 sec，使细胞沉淀下来，吸除上清后加入 500 μl Buffer RLT（< 8×10^6 个细胞），涡旋震荡

或移液器吹打直至无明显细胞团即可。

C. 动物组织：取新鲜组织约 15−25 mg（< 30 mg）加入 500 µl 裂解液 RLT，用玻璃匀浆器或电动匀浆器将组织研磨均匀。若用液氮研磨，在液氮中研磨组织成粉末后，取适量组织细粉 15-25 mg（< 30 mg）转移至预装有 500 µl Buffer RLT Plus 的 1.5 ml 离心管，涡旋震荡或移液器吹打直至无明显细胞团即可。

▲若研磨匀浆后不溶物碎片太多，可将匀浆后裂解物 13, 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。将上清液转移到新的 1.5 ml 离心管内。

二、RNA 提取

1. 向处理好的匀浆液中加入 0.5 倍体积的无水乙醇（约 250 µl），涡旋震荡混匀或者移液器吹打混匀。

   ▲若加乙醇后出现浑浊或有絮状物产生，属正常现象，立即吹打混匀，不要离心。

2. 立即将上述混合液加入至 RNA 吸附柱内（已放入收集管中），静置 1 min，13, 000 rpm 离心 30 sec，**弃滤液**，将吸附柱放回收集管。

3. 向吸附柱中加入 700 µl 去蛋白液 RW1，室温放置 30 sec，13, 000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。

4. 向吸附柱中加入 500 µl 漂洗液 RW（**使用前请检查是否已加入无水乙醇**），13, 000 rpm 离心 15 sec，弃滤液。

5. 重复步骤 4 一遍。

6. 将吸附柱放回空收集管中，13, 000 rpm 空甩离心 2 min。尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

7. 将吸附柱转移至新的 1.5 ml 离心管中，向吸附柱膜中央悬空滴加 30−50 µl 的 RNase-free ddH_2O，静置 1 min，13, 000 rpm 离心 1 min。

   ▲洗脱体积建议不少于 30 µl，体积过小会影响核酸回收效率。

   ▲以下步骤都可以帮助提高 RNA 产物浓度：

   RNase-free ddH_2O 于洗脱前先在 70-90°C 预热；

   将第一次洗脱液重新加入吸附柱进行第二次洗脱。

8. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或−85°C ~−65°C 保存。