EASYspin Plus Tissue & Cell RNA Kit

EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

目录号：RN28

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(RN2801)
裂解液 RLT Plus	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
DNA 清除/RNA 吸附通用柱和收集管	室温	100 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。

❖ 产品介绍：

本品采用独有的 DNA 清除/RNA 吸附通用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。得到的总 RNA 纯度高，gDNA 残留少，无蛋白和其他杂质污染，可直接用于 RT-PCR、RT-qPCR、RNA 高通量测序建库、芯片分析等多种下游实验。

❖ 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. DNA 清除/RNA 吸附通用柱可以 1 min 过滤清除 gDNA，不需要繁琐的 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR、高通量测序建库等实验。最快全程仅需 8 min。最大限度的简化了操作和减少了 RNA 降解几率。
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）。
5. 通用性强，普通动物组织和细胞样本均可使用。

❖ **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 Plus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. 本试剂盒可去除体系中大部分的DNA残留，纯化获得的RNA通常无需使用DNase I处理即可用于下游实验操作。不同样本核酸含量相差大，如果下游实验对痕量DNA十分敏感，可以使用DNase I（货号：RN45）进一步清除DNA污染。或者提取过程中进行DNase柱上消化（货号：RN34 DNase I 柱上消化试剂盒）。
4. **样品处理量不要超过DNA清除/和RNA吸附通用柱的处理能力，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。**

❖ **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 Plus 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 Plus（< 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 Plus（< 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 Plus，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。

二、RNA 提取

1. 将处理好的匀浆液加到 DNA 清除/RNA 吸附通用柱上(柱子放在 2 ml 收集管内)，13, 000 rpm 离心 1 min，丢弃通用柱，**保留收集管中的滤液（RNA 在滤液中）**。
2. 向滤液中加入 0.5 倍滤液体积的无水乙醇（约 250 µl），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。
3. 立即将上述混合液加入至一个新的 DNA 清除/RNA 吸附通用柱内（已放入收集管中），静置 1 min，13, 000 rpm 离心 30 sec，**弃滤液**，将通用柱放回收集管。
4. 向通用柱中加入 700 µl 去蛋白液 RW1，室温放置 30 sec，13, 000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。
5. 向通用柱中加入 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。

6. 重复步骤 5 一遍。
7. 将通用柱放回空收集管中，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。
8. 将通用柱转移至新的 1.5 ml 离心管中，向通用柱膜中央悬空滴加 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通用柱进行第二次洗脱。
9. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或−85°C ~−65°C 保存。