版本号:250802

EASYspin Plus Bone Tissue RNA Kit
EASYspin Plus 骨组织 RNA 快速提取试剂盒

目录号：RN54

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性：**

试剂盒组成	保存	50 次(RN5401)
裂解液 CLB	室温	50 ml
PLANTaid	室温	5 ml
裂解液 RLT Plus	室温	25 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说明加无水乙醇
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：**

骨组织坚硬、骨细胞密度低、而且外周基质含有大量黏蛋白（蛋白多糖）和 RNA 难以分离，无法用传统 Trizol 法进行高质量提取。本试剂盒采用独有的不含苯酚/氯仿/beta 巯基乙醇配方的裂解液，并添加多种成分去除骨组织蛋白多糖。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。适用于从多种骨组织或细胞中高效

提取高纯度、高质量的总 RNA，最快仅需 30 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. 完全不使用有毒的苯酚/氯仿/beta 巯基乙醇等，也不需要乙醇沉淀。
2. 简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成，世界上领先简单快速的试剂盒。
3. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化，可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 适应性广泛，可以提取各种骨组织包括矿化骨组织。
5. 多次柱漂洗确保高纯度，OD_{260}/OD_{280} 典型的比值达 1.9～2.2，基本无 DNA 残留,可用于 RT-PCR，Northern-blot，二代测序和各种实验。

❖ **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. 需要自备乙醇，研钵或者其它合适的破碎骨组织装置。
3. 样品处理量不要超过DNA清除/和RNA吸附通用柱处理能力，否则造成DNA残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品DNA/RNA含量时可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
4. 裂解液CLB和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。**
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 EASYspin Plus 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）。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

⇨ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量无水乙醇!

⇨ 取 1 ml 裂解液 CLB 至离心管内(如果 CLB 气温低有析出或者沉淀需先置于 65°C 水浴重新溶解），在裂解液 CLB 中加入 100 µl PLANTaid。颠倒混匀后 65°C 水浴中预热。多个样品按照比例放大准备。

1. 液氮研磨法:

a. 骨钳夹碎骨组织后放入研钵（研钵在 180 度干烤 2 小时），加入液氮后反复研磨成细粉，注意液氮蒸发后不断补加保存液氮一直存在。

b. 转移 30 mg−150 mg 细粉加至预热的裂解液 CLB（已加有 PLANTaid）离心管中。立即剧烈涡旋 30-60 sec 或者吸头吹打混匀裂解直得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 sec)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。

▲骨组织差异极大，用户应该根据不同骨组织的具体情况和实验结果增减或者减少处理的样品量。以获得更好的产量和纯度。

c. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

2. 其它骨组织破碎方法：

a. 取 30mg-150mg 骨组织加入 1ml 预热的裂解液 CLB（已加有 PLANTaid）高速均质仪粉碎匀浆。或者取 30mg-150mg 液氮冷冻包埋切片粉碎的骨头加入裂解液 CLB（已加有 PLANTaid）粉碎匀浆。或者按照高速均质仪或者研磨机厂家说明在液氮或者冷冻条件下将 30 mg−150 mg 骨组织击打破碎成细粉，加入 1ml 预热的裂解液 CLB（已加有 PLANTaid）裂解匀浆。。

b. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

3. 短时放回 65°C 水浴中（10 min），中间偶尔颠倒振荡 1−2 次帮助裂解。

4. 将裂解物室温 13, 000 rpm 离心 10 min，沉淀不能裂解的碎片。

5. 取裂解物上清转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(**0.5 体积**)，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。

   ▲若上清表面有漂浮物，用吸头挑开吸取下面液体即可。

6. 将混合物(每次小于 750 µl，多可以分两次加入)加入 DNA 清除/RNA 吸附通用柱内（通用柱放入收集管中）静置 1 min，13, 000 rpm 离心 2 min，弃掉废液。

   ▲ 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。

7. 将上一步通用柱放在一个干净 2 ml 离心管内（不用 RNase free 或者 DEPC 处理，一般干净的新离心管即可。（如手头一时找不到 2 ml 离心管，也可取一套新的通用柱的干净收集管用），在通用柱内加 500 µl 裂解液 RLT Plus，13, 000 rpm 离心 30 sec，丢弃通用柱，**保留收集管中的滤液（RNA 在滤液中）**。加入 0.5 倍体积（250 µl）的无水乙醇，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。

8. 立即将混合液加入至一个新的 DNA 清除/RNA 吸附通用柱内（通用柱放入收集管中），静置 1 min，13, 000 rpm 离心 2 min，**弃滤液（RNA 此时吸附在通用柱上，不在滤液内）**，将通用柱放回收集管。

   ▲ 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。

9. 加 700 µl 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，13, 000rpm 离心 30 sec，弃掉废液。

10. 加入 500 µl 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），13, 000 rpm 离心 30 sec，弃掉废液。加入 500 µl 漂洗液 RW，重复一遍。

11. 将通用柱放回空收集管中，13, 000 rpm 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。

12. 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（洗脱前在 70−90°C 水浴中加热可提高产量），静置 1 min，13, 000 rpm 离心 1 min。

    ▲ 洗脱缓冲液体积不应少于 30 µl，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。