

# M5 Universal RNA Mini Kit

## 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

### 使用说明书 (Version 3)

产品名称	单位	货号
M5 Universal RNA Mini Kit	50T	MF036-01
M5 Universal RNA Mini Kit	4x50T	MF036-04

**【储存条件】** 室温储存，温度低时溶液可能形成沉淀，37°C 水浴加热恢复澄清后再使用。

#### 【产品简介】

本试剂盒利用聚合美独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase-Free H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

#### 【产品特色】

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
- 不需要苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀，快速方便，一般可在 30 分钟内完成。
- 多次柱漂洗确保高纯度，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 典型的比值达 2.1-2.2，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

#### 【产品组份】

	50T	注意事项
裂解液 RLT	30ml	室温密闭干燥保存
去蛋白液 RW1	40ml	室温密闭干燥保存
漂洗液 RW	10ml	初次使用前加入 42ml 无水乙醇
70%乙醇	9ml 瓶	提供 9ml RNase-Free H <sub>2</sub> O，初次使用前加入 21ml 无水乙醇
RNase-Free H <sub>2</sub> O	10ml	室温密闭干燥保存
RNase-Free 吸附套管	50 套	室温密闭干燥保存

#### 【注意事项】

- 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，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
- 需要自备乙醇（尽量新开封或者 RNA 专用），一次性注射器，研钵。
- 裂解液 RLT 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，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。
- 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：
  - 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染。
  - 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
  - RNA 在裂解液 RLT 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。
  - 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。）
- 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，本公司的 EASYspin 系列 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留（一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见）影响不是很大，如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR，我们建议在进行模板和引物的选择时：

  - 选用跨内含子的引物，以穿过 mRNA 中的连接区，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 处理。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(cleanup)，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。

#### 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 5 kb 和 2kb，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，否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

**纯度：** OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 读数（10mM Tris, pH7.5）在 2.1-2.2 之间（100% 纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右，很多公司无法达到这个标准，所以 1.9-2.0 就凑合用了，但是我们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2）。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品，假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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 水稀释 n 倍，用 RNase-free 水将分光光度计调零，取稀释液进行 OD<sub>260</sub>，OD<sub>280</sub> 测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度 (ng/μl) = (OD<sub>260</sub>) × (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（见附录一）反复吹打细胞裂解（裂解后直接接操作步骤项 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. 13000rpm 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 $\mu$ l（ $<5 \times 10^6$  细胞）或 600 $\mu$ l（ $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  细胞）裂解液 RLT，用移液器反复吹打充分裂解（直到看不细胞团为止）。

D. 立刻接操作步骤项下 3。

**2. 动物组织（例如鼠肝脑）**

**A1. 匀浆器匀浆:** 新鲜组织加入 350 $\mu$ l（ $<20$ mg 组织）或者 600 $\mu$ l（20-30mg 组织）的裂解液 RLT 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 $\mu$ l/600 $\mu$ l 组织裂解液 RLT 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，将匀浆后裂解物 13000rpm 离心 3 分钟去除碎片或者不溶物。将上清液转移到新的 1.5ml 离心管内。

B. 立刻接操作步骤项下 3。

3. 较精确估计裂解物（上清）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。

4. 将混合物（每次小于 720 $\mu$ 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，13000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

5. 加入 700 $\mu$ l 去蛋白液 RW1，室温放置 30 秒，13000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

6. 加入 500 $\mu$ l 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇），13000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500 $\mu$ l 漂洗液 RW，重复一遍。

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

8. 取出吸附柱 RA，放入一个干净 1.5ml 离心管中（自备，离心时稍微错开斜放盖子，以便能带着盖子离心），根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 $\mu$ l RNase-Free H<sub>2</sub>O，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  $\mu$ l（体积过小影响回收效率）。将离心得到的 RNA 溶液加回到吸附柱重复洗脱一遍可以提高 RNA 浓度。

附录一：贴壁培养细胞数量表（注：一般情况下，3.5cm 直径培养皿或者更小培养容器加 350 $\mu$ l 裂解液 RLT，6cm 直径培养皿或者更大培养容器加 600 $\mu$ l 裂解液 RLT。最大处理量不超过  $10^7$  个细胞。）

培养器皿	底面积(cm <sup>2</sup> )	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	$7 \times 10^6$

**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。