

M5 Universal Plus RNA Mini Kit

加强型组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Universal Plus RNA Mini Kit	50T	MF167-01

【储存条件】

室温储存 12个月不影响使用效果。本试剂盒所有溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，可在 37°C 水浴加热几分钟，恢复澄清后再使用。

【产品简介】

本公司独家推出 EASYspin 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，又独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后裂解混合物通过一个基因组 DNA 清除柱，基因组 DNA 被清除而 RNA 穿透滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离子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 water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

【产品特色】

1. 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。
2. 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。
3. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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 plus	30 ml	室温密闭干燥保存
去蛋白液 RW1	40 ml	室温密闭干燥保存
漂洗液 RW	10 ml	初次使用前请按瓶标说明加入 42ml 无水乙醇
70%乙醇	9 ml 瓶	提供 9ml RNase-Free H ₂ O， 使用前加入 21ml 无水乙醇
RNase-Free H ₂ O	5 ml	室温密闭干燥保存
基因组 DNA 清除套管	50 套	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】

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，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 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 5mg 就会超过柱子处理能力。COS 细胞 RNA 含量丰富，超过 3x10⁶ 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 3-4x10⁶，组织不超过 10mg。将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
3. 裂解液 RLTplus 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。

4. 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) 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。
- 4) 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。)

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 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: 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 (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)。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 10mM 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 水稀释 n 倍, 用 RNase-free 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, 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇!>

1. 组织培养细胞

- a. 收集 <10⁷ 悬浮细胞到一个 1.5ml 离心管, 对于贴壁细胞, 孔板培养可以直接裂解, 细胞瓶培养应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
- b. 13,000rpm 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. 轻弹管壁将细胞沉淀完全松散重悬, 加入 350μl (<5×10⁶ 细胞) 或者 600μl (5×10⁶-1×10⁷ 细胞) 裂解液 RLT plus, 吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。
- d. 用带钝针头的一次性 1 ml (配 0.9mm 针头) 注射器抽打裂解物 5-10 次或直到得到满意匀浆结果 (或者电动匀浆 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。
- e. 将裂解混合物或匀浆混合物全部加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内)。接操作步骤项下 3。

2. 动物组织 (例如鼠肝脑)

- a. 电动匀浆: 新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块, 加入 350μl (<20mg 组织) 或者 600μl (20-30mg 组织) 的裂解液 RLT 后电动彻底匀浆 20-40 秒。
- b. 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 350μl/600μl 组织裂解液 RLT plus 的 1.5ml 离心管中, 用手剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。用带钝针头的一次性 1 ml (配 0.9mm 针头) 注射器抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果 (或者电动匀浆 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。
- c. 将匀浆后裂解物 13,000rpm 离心 3 分钟, 沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物, 将裂解物上清全部加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内)。
- d. 接操作步骤项下 3。

3. 立刻 13,000 rpm 离心 60 秒，保留滤过液（RNA 在滤过液中）。

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。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积（通常为 350 μ l/600 μ l，滤过时候损失体积应该减去），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。

5. 立刻将混合物（每次小于 700 μ 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）13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

6. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

7. 加入 500 μ l 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW，重复一遍。

8. 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。

9. 取出吸附柱 RA，放入一个 1.5ml RNase free 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 μ l RNase-Free H₂O（事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量），室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

10. 如果预期 RNA 产量 >30 μ g，加 30-50 μ l RNase-Free H₂O 重复步骤 9，合并两次洗脱液，或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍（如果需要 RNA 浓度高）。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高，分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%，但是浓度要低，用户根据需要选择。

备注：对于一些特殊样本，提取方法只在样本研磨这步有所差异，其他步骤都相同。

A、**脂肪组织**，方法沿用上述动物组织操作步骤，唯一不同的地方是：匀浆处理后，用枪头吸取移走上面漂浮的油脂层，加入 350 μ l 裂解液 RLT，其他操作步骤不变。

B、对于粪便组织，如果**只提取粪便中病毒 RNA**，取 100mg 粪便，加入 100 μ l PBS 溶液，Vortex 震荡混匀，然后 13000rpm 离心 3min，转移上清 100 μ l 到一个新 1.5ml 离心管中，加入 350 μ l 裂解液 RLT，其他操作步骤不变。

C、对于粪便组织，如果**提取粪便中总 RNA**（包括细菌，真菌和病毒的 RNA），将粪便按动物组织液氮研磨成细粉的操作步骤进行。

【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。