

## M5 EASYspin Plus 动物骨组织 RNA 快速提取试剂盒使用说明书

| 产品名称                               | 单位  | 货号       |
|------------------------------------|-----|----------|
| M5 EASYspin Plus 动物骨组织 RNA 快速提取试剂盒 | 50T | MF159-01 |

### 【储存条件】

本试剂盒按照指示储存 12 个月不影响使用效果。

1. 不合适的储存于低温（4℃或者-20℃）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（15℃-25℃）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。

### 【产品简介】

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/氯仿配方的裂解液，并添加多种成分去除骨组织蛋白多糖。同时独特基因组 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。独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，离心沉淀去除多糖和次级代谢产物，然后裂解混合物用乙醇调节 RNA 结合吸附到基因组 DNA 清除柱，然后 RNA 被选择性洗脱滤过，吸附在基因组 DNA 清除柱上的残留 DNA 无法洗脱连同柱子一起丢弃从而清除掉 DNA。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 H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

### 【产品特色】

1. 完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 简捷，单个样品操作一般可在 35 分钟内完成，最简单快速的试剂盒。
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，OD260/OD280 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。

### 【产品组份】

|                             | 50T   | 注意事项                  |
|-----------------------------|-------|-----------------------|
| 裂解液 CLB                     | 50 ml | 室温密闭干燥保存              |
| PLANTaid                    | 5 ml  | 室温保存                  |
| 裂解液 RLT plus                | 25 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                      | 10ml  | 初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇 |
| RNase-Free H <sub>2</sub> O | 5ml   | 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(RA)         | 50 套  | 室温密闭干燥保存              |

### 【注意事项】

1. 所有的离心步骤均可在室温完成（4℃离心也可以），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. 需要自备乙醇，研钵或者其它合适的破碎骨组织装置。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 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。

- 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 柱上消化处理。

## 【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 瓶中加入指定量的无水乙醇!>

**实验前准备:** 取 1ml 裂解液 CLB 至离心管内(如果 CLB 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 100μl 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:

- 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。
- 转移 100mg 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 秒或者用吸头吹打混匀裂解直得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。
- 立刻接操作步骤的步骤 3。

### 2. 其它骨组织破碎方法:

- 取 100mg 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 100mg 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。
- 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 1-2 次帮助裂解。

4. 将裂解物 4°C 13,000 rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。

5. 取裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量) 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 720μl, 多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱中, (清除柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 2 分钟, 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. 将基因组 DNA 清除柱子放在一个干净 2ml 离心管内 (不用 RNase free 或者 DEPC 处理, 一般干净的新离心管即可。也可使用 RNA 吸附柱配套的新的干净收集管), 在基因组清除柱内加 500μl 裂解液 RLT Plus, 13,000 rpm 离心 30 秒, 收集滤液 (RNA 在滤液中), 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (通常为 450-500μl 左右, 滤过时候损失体积应该减去), 加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 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. 立刻将混合物(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) 13,000 rpm 离心 2 分钟, 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。
9. 加 700 $\mu$ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 1 分钟, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
10. 加入 500 $\mu$ l 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 13,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。加入 500 $\mu$ l 漂洗液 RW, 重复一遍。
11. 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。
12. 取出吸附柱 RA, 放入一个 RNase free 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 $\mu$ l RNase free water (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。
13. 如果预期 RNA 产量 > 30 $\mu$ g, 加 30-50 $\mu$ l RNase free water 重复步骤 12, 合并两次洗液, 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】**

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。