

# 超快速细胞总RNA提取试剂盒

货号: HKR04

## 【产品信息】

| 产品名称           | 产品货号  | 规格  | 有效期  |
|----------------|-------|-----|------|
| 超快速细胞总RNA提取试剂盒 | HKR04 | 50T | 18个月 |

## 【产品简介】

本试剂盒是用于从动物组织和细胞样本中经柱式法提取纯化 RNA 的广谱型试剂盒。试剂盒采用了特别的裂解缓冲系统, 无需氯仿等有机试剂抽提, 并分别经过 DNA Eraser Spin Column (去除基因组 DNA) 以及 RNA Spin Column (结合 RNA), 可从 5-20 mg 的动物组织、106-107 新鲜培养的细胞中快速提取高纯度的 RNA, 整个提取过程最快仅需 30 min 即可完成。获得的 RNA 可以直接用于 Northern 杂交、斑点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RNA 分解酶的保护分析、RT-PCR、Real Time RT-PCR 和构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

## 【产品组成】

| 货号     | 名称       | 规格          |
|--------|----------|-------------|
| HKR04A | 裂解液      | 30mL        |
| HKR04B | 漂洗液      | 20mL        |
| HKR04C | 无 RNA 酶水 | 10mL        |
| HKR04D | 2 袋      | 50 套        |
| HKR04E | RNA 稳定剂  | 600 $\mu$ L |
| HKR04F | DNA 酶液   | 300 $\mu$ L |

(注: 附赠的DNA酶水需要分装成小份置于-20℃保存。)

## 【储存与运输】

室温运输; 室温保存, 有效期 18 个月。

## 【使用方法】

第一次使用前请先向漂洗液中加入 35mL 无水乙醇。

### 1. 配制裂解液:

根据样本量配置适量的裂解液, 吸取适量裂解液中加入 RNA 稳定剂至终浓度 2%(如 1mL 裂解液中加入 20  $\mu$ L RNA 稳定剂)。此裂解液最好现用现配, 配好的裂解液 4 $^{\circ}$ C 可放置三个月。

### 2. 样本匀浆:

#### (1) 悬浮细胞

700 rpm 离心 5 min 收集悬浮细胞到一个无RNA酶离心管, 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)。轻弹管壁将细胞沉淀完全松散重悬, 加入 350  $\mu$ L (少于  $5 \times 10^6$  细胞) 或者 600  $\mu$ L ( $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  细胞) 裂解液, 剧烈振荡 20s 混匀, 可延长充分裂解。

#### (2) 贴壁细胞

孔板培养的贴壁细胞可以直接加入 350  $\mu$ L (少于  $5 \times 10^6$  细胞) 或者 600  $\mu$ L ( $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  细胞) 裂解液, 室温裂解 5min, 于显微镜下观察细胞的裂解情况 (可采用细胞刮刮取细胞辅助裂解)。将裂解液收集至无RNA酶EP管中, 剧烈振荡 20s 混匀, 可延长充分裂解。

#### (3) 动物组织

电动匀浆 (用于新鲜组织): 新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块, 加入 600  $\mu$ L (小于 20mg 组织) 或者 1000  $\mu$ L (20-40mg 组织) 的裂解液后电动彻底匀浆 20~40s。

液氮研磨+匀浆 (适用于冻存组织): 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 600  $\mu$ L/1000  $\mu$ L 组织裂解液的 1.5mL 离心管中, 剧烈振荡 20s, 充分裂解。

### 3. 可选步骤 (推荐):

用带钝针头的一次性 1mL (配 0.9mm 针头) 注射器抽打裂解物 10 次直到得到满意匀浆结果 (或者电动匀浆 30s)。后将匀浆后裂解物 13,000rpm 离心 3min, 沉淀可能存在的裂解困难的碎片或者不溶物, 将裂解物上清小心转到一个新离心管。接操作步骤 4。

**提示:** 离心后, 如果在上清液表面形成一层固体状物时, 只要在吸取上清前用枪头将固体物拨开即可

4. 较精确估计裂解物体积, 并记录数值。加入此数值一半体积的无水乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即盖上盖子颠倒混匀 10-20 次, 使液体成淡蓝色浑浊状且有泡沫。

5. 将混合物 (每次小于 700  $\mu$ L, 多于此体积可以分批加入) 加入 RNA 吸附柱中 (吸附柱放入收集管中), 13,000rpm 离心 45s, 弃掉收集管中的废液。

6. 向 RNA 吸附柱中加入 700  $\mu$ L 漂洗液 (请先检查是否已加入无水乙醇 I), 室温放置 3min 后, 13,000rpm 离心 45s, 弃掉收集管中的废液。

7.向RNA吸附柱中加入500  $\mu$ L漂洗液（请先检查是否已加入无水乙醇），13,000rpm离心45s，弃掉收集管中的废液。加入500  $\mu$ L漂洗液，重复一遍。

8.将RNA吸附柱放回空收集管中，13,000rpm离心4min，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，放入无RNA酶离心管（吸附柱可适配1.5mL及2mL离心管）中，在吸附膜的中间部位加30-50  $\mu$ L无RNA酶水（事先在70 $^{\circ}$ C水浴中预热3min可提高RNA产量），室温放置1min，12,000rpm离心1 min。此步骤建议选用优质盖分离式离心管，防止盖子在离心过程中断裂。

10.如果预期RNA产量>30  $\mu$ g，加30-50  $\mu$ L无RNA酶水重复步骤8，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。前者分两次洗脱合并洗脱液的RNA产量高，但是浓度要低；后者重复洗脱两遍的RNA洗脱液RNA浓度高，用户根据需要选择。

#### 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 $^{\circ}$ C烘烤 4h，塑料器皿可在 1%DEPC 水中浸泡过夜后再灭菌，即可去除 RNase。
- (4) 配制溶液应使用无 RNase 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 $^{\circ}$  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 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 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，如果需要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR，我们建议在模板和引物的选择时：

- (1) 选用跨内含子的引物，这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应；
- (2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对；
- (3) 若实验对基因组的少量残留极其敏感，可用试剂盒附赠的 DNA 酶处理：RNA 上柱 4000g 离心弃去液体后，按照每个样品 10  $\mu$ L DNA 酶液加 40  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，混匀后向每个离心柱中央加 50  $\mu$ L，室温放置 5 分钟，然后加入漂洗液，进行后续操作；

#### 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  $\times$  TBE 电泳缓冲液；150v，15min）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 5kb 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。（电泳出现 RNA 降解时首先请排除电泳液及电泳槽

的 RNase 污染)。

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 1.8-2.1 之间。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 10 mM Tris(pH 7.5) 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 和 OD280 测定, 按照以下公式进行 RNA 浓度的计算: 终浓度 (ng/ $\mu$ L) = (OD260)  $\times$  (稀释倍数 n)  $\times$  40。

#### 【注意事项】

1. 裂解液和漂洗液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。
2. 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 应在 37°C 水浴加热几分钟至溶液恢复澄清后使用。
3. 漂洗液呈淡黄色为正常现象不影响使用。
4. 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。