

M5 Universal RNA Mini Kit 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 RNA Mini Kit	50T	MF036-01
M5 Universal RNA Mini Kit	4x50T	MF036-04

【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 H₂O 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 Whatman 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. 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	50ml	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	初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇
70%乙醇	50ml 瓶	提供 4ml 和 9ml RNase-Free H ₂ O，使用前加入无水乙醇
RNase-Free H ₂ 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】

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. 需要自备乙醇（尽量新开封或者 RNA 专用），一次性注射器，研钵。
3. 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。
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. 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，由于采用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，我们建议在模板和引物的选择时：

 - 1) 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。
 - 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) 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。
 - 4) 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: 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

- 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。
- 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。
- 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, 吹打混匀后用手剧烈振荡 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 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。
- 接操作步骤项下 3。

2. 动物组织 (例如鼠肝脑)

- 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。
- 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 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。
- 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, 将裂解物上清小心转到一个新离心管。
- 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. 立刻将混合物 (每次小于 700μl, 多可以分两次加入) 加入一个吸附柱 RA 中, 13,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。

5. 加 700μl 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 秒, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。如果 DNA 残留明显, 可在加入 RW1 后室温放置 5 分钟再离心。

6. 加入 500μl 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 500μl 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 RNase free 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50μl RNase-Free H₂O (事先在 70°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。

9. 如果预期 RNA 产量 > 30μg, 加 30-50μl RNase-Free H₂O 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 (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。