

DiSpin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

货号：DP228-01

规格：50 次

保存：15-25℃

【产品简介】

本产品适用于快速提取动物细胞和易裂解动物组织的总 RNA，在 DiSpin 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，又增加了基因组 DNA 清除柱，以便有效清除 gDNA，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，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和离心的步骤，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。

【产品组分】

货号	组分	体积
DP228-101	裂解液 RLT Plus	50 ml
DP228-102	去蛋白液 RW1	40 ml
DP228-103	漂洗液 RW（首次使用前加入 42ml 无水乙醇）	10 ml
DP228-104	RNase-free Water	10ml
DP228-105	RNase-free Water（首次使用前加入 21ml 无水乙醇配成 70%乙醇）	9 ml
DP228-106	吸附柱 RA 和收集管（RNase-free）	50 套
DP228-107	基因组 DNA 清除柱和收集管	50 套

【保存条件】

室温保存，保质期一年。

【产品特点】

1. 不需要使用苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 15 分钟内完成。
3. 独有的基因组 DNA 清除柱确保有效清除 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 比值达 2.1-2.2，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 等实验。

【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 的离心机。
2. 样品处理量不能超过基因组 DNA 吸附柱和 RNA 吸附柱处理范围，否则会造成 DNA 残留或者产量降低。不同的组织和细胞种类 RNA/DNA 有较大差别，例如胸腺脾脏 DNA 含量丰富，超过 5mg 就会超过柱子处理范围。COS 细胞 RNA 含量丰富，超过 3x10⁶ 细胞就会超过柱子吸附范围。在不清楚样品 DNA/RNA 含量时建议先使用较少的样品处理量，例如细胞不超过 3x10⁵，组织不超过 10mg，后面根据具体试验情况增加或者减少处理量。
3. 裂解液 RLT Plus 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 Plus 中时不会被RNase 降解。但提取后继续处理过程中需要使用不含RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃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℃放置过夜，高压灭菌。）

5. 关于 DNA 的微量残留：

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，建议在进行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 处理以提高效果。
- 4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在吸附柱上进行 DNase I 处理。

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参考指标。高质量的 RNA，OD260/OD280 读数在 2.1-2.2 之间，在 RNA 纯度为 100%的情况下，本产品比值可以达到 2.1-2.2 高标准。OD260/OD280 读数受测量测定所用溶液的 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。

【使用方法】

1. 培养细胞

A. **贴壁细胞：**无需消化，完全吸干培养液直接加入推荐量裂解液 RLT Plus（见附录一），反复吹打细胞裂解，取裂解后的匀浆液全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内），接着操作步骤 3；不方便直接裂解的，可以用细胞刮刮下细胞，或者胰蛋白酶消化后吹打下来将细胞收集到 1.5ml 离心管。

悬浮细胞：收集 $<10^7$ 悬浮细胞到一个 1.5ml 离心管。

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 350 μl ($<5 \times 10^6$ 细胞) 或 600 μl (5×10^6 - 1×10^7 细胞) 裂解液 RLT Plus，用移液器反复吹打充分裂解（直到看不见细胞团为止）。

D 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）。

E 立刻接操作步骤 3。

2. 动物组织（例如鼠肝脑）

A **匀浆器匀浆**：新鲜组织加入 350 μ l (<20mg 组织) 或者 600 μ l (20-30mg 组织) 的裂解液 RLT Plus 后彻底匀浆。

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 μ l /600 μ l 组织裂解液 RLT Plus 的 1.5ml 离心管中，手持剧烈振荡 20 秒，较难裂解的样品可用移液器反复吹打匀浆。

注意：若将匀浆后不溶物，碎片较多，可将裂解物 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。将上清全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

B 将研磨均匀的匀浆全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

C 立刻接操作步骤 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. 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，可用移液器测量），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 720 μ l，可分两次加入）加入吸附柱 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 30 秒，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

7. 加入 500 μ l 漂洗液 RW（请确认已加入无水乙醇！），13,000 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，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l RNase free water，室温放置 1 分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟得到 RNA 溶液。

洗脱缓冲液体积不应小于 30 μ l，体积过小影响回收效率。如需更高浓度的 RNA，将离心得到的 RNA 溶液加回到吸附柱重复洗脱一遍。

附录一：贴壁培养细胞数量表

培养器皿	底面积 (cm ²)	加培养液量 (ml)	可获细胞量
24 孔培养板	2	1.0	5×10 ⁵
6 孔培养板	9.6	2.5	2.5×10 ⁶
3.5cm 培养皿	8	3.0	2.0×10 ⁶
6cm 培养皿	21	5.0	5.2×10 ⁶
25cm 塑料培养瓶	25	5.0	5.2×10 ⁶
100ml 玻璃培养瓶	33	10.0	7×10 ⁶

注：一般情况下，3.5cm 直径培养皿或者更小培养容器加 350 μ l 裂解液 RLT Plus，6cm 直径培养皿或者更大培养容器加 600 μ l 裂解液 RLT Plus。最大处理量不超过 10⁷ 个细胞。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。