M5 纤维类组织 RNA 快速提取试剂盒
使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 纤维类组织 RNA 快速提取试剂盒	50T	MF168-05

【储存条件】

1) 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，此时不应该直接使用，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清。

2) 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。

3) 为避免降低活性，方便运输，提供蛋白酶 K 为冻干粉状，收到后，可短暂离心后，加入 0.25ml（20 次）和 0.5ml（50 次）RNase-free H_2O 溶解。因为反复冻融可能会降低酶活性，因此溶解后可立即按照每次使用量分装冻存，-20℃保存。

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。

【产品简介】

独特的裂解液/β-巯基乙醇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 H_2O 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) 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。

3) 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。

4) 多次柱漂洗确保高纯度，OD_{260}/OD_{280} 典型的比值达 1.9～2.0，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	50 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指定量的无水乙醇**
RNase-Free H_2O	40 ml	室温密闭干燥保存
蛋白酶 K 粉末	20mg	-20 度
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， β-巯基乙醇，一次性注射器，研钵，水浴锅等。

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℃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：**

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。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：OD_{260}/OD_{280} 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA，OD_{260}/OD_{280} 读数（10mMTris, pH7.5）在 1.8-2.1 之间。OD_{260}/OD_{280} 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 OD_{260}/OD_{280} 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 OD_{260}，OD_{280} 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】

提示：

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!

操作前在裂解液 RLT 中加入β-巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml RLT 中加入 10μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT 4℃可放置一个月。

1. 充分破碎匀浆（非常重要，否则严重降低产量）

a. 电动破碎匀浆（首选强烈推荐，产量最高结果最稳定）：取约 10-20mg（<30mg）新鲜组织，加入 300μl 裂解液 RLT 后用电动刀片匀浆机（Rotor-Stator 如 TissueRupter）或者电动玻珠研磨机（Bead Mill 如 TissueLyser）按照机器使用说明彻底破碎匀浆组织细胞。

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 10-20mg（<30mg）转入装有 300μl 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。讲匀浆转入新离心管。

c. 研钵研磨匀浆： 取适量组织细粉 10-20mg（<30mg）放入小研钵后，迅速加入 300μl 裂解液 RLT 后直接室温充分研磨匀浆。将匀浆转入新离心管。

注意：如果匀浆沾在研钵内损失比较大，可以按照比例适当提高起始组织用量和裂解液 RLT 用量。此外，也可以先用液氮研磨组织成细粉，然后液氮刚刚蒸发完的时候加入裂解液 RLT 充分研磨匀浆，可以提高研磨效果。

2. 吸取 590μl RNase-free H_2O 至匀浆中。加入 10μl 蛋白酶 K，移液器吹打混匀。

3. 55℃下水浴 10 分钟。

4. 室温下以 13，000rpm 离心 5 分钟。这样将会形成小量的组织碎片沉淀，而且在上清的顶部可能看见少量的漂浮物。

5. 转移上清至一个新的 1.5ml 离心管中。

注意：转移时不要带入沉淀物，而且移液枪头必须放在上清漂浮物之下。漂浮物通常可能会黏附在枪头的外壁，注意不能将其带入离心管中。

6. 较精确估计裂解物(上清)体积，加入 0.5 体积的无水乙醇（一般为 450μl），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。

7. 立刻将混合物(每次小于 700μl，可以分两次加入)加入同一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。

8. 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。

9. 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。

10. 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。

11. 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 water（事先在 70-90℃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。

12. 可选：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 RNA 浓度可以适当提高一些。如果预期 RNA 产量>30μg，可加 30-50μl RNase free water 重复步骤 11，合并两次洗脱液，可以提高产量 15–30%，但浓度会有所降低。

【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。