



## S6 HiPer Universal RNA Mini Kit 组织/细胞RNA快速提取试剂盒

产品名称	单位	货号
S6 HiPer Universal RNA Mini Kit	50T	S6036-01
S6 HiPer Universal RNA Mini Kit	4x50T	S6036-04

### 【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 Scintol 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 从硅基质膜上洗脱下来。

### 【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，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值达 2.1-2.2，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 等相关实验。

### 【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 <sub>2</sub> O，使用前加入无水乙醇
RNase-Free H <sub>2</sub> 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下完成，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. 防止 RNase 污染，注意以下几个方面：
  - 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 中不会被 RNase 降解。提取的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<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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)。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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 H<sub>2</sub>O 将分光光度计调零，取稀释液进行 OD<sub>260</sub>, OD<sub>280</sub>

测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度 (ng/μl) = (OD<sub>260</sub>) × (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 <math>10^7</math> 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，注意上清有残留会稀释裂解液导致产量纯度降低。
- 重悬细胞沉淀，加入 350μl (<math>5 \times 10^6</math> 细胞) 或者 600μl (<math>5 \times 10^6</math>-<math>1 \times 10^7</math> 细胞) 裂解液 RLT，手指轻弹管底使沉淀悬浮，用枪吹打混匀，用手剧烈振荡 20 秒，使充分裂解。
- 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 (或者电动涡旋 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- 接以下操作步骤 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 (<math><20\text{mg}</math> 组织) 或者 600μl (20-30mg 组织) 的裂解液 RLT，电动匀浆 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 (或者电动匀浆 30 秒) 直至匀浆彻底，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 H<sub>2</sub>O (事先在 70°C 水浴中加热可提高产量)，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。

9. 如果预期 RNA 产量 > 30μg，加 30-50μl RNase-Free H<sub>2</sub>O 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。