

S6 HiPer Universal Plus RNA Mini Kit 加强型组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒说明书

产品名称	目录编号	包装单位
S6 HiPer Universal Plus RNA Mini Kit	S6167-01	50T
S6 HiPer Universal Plus RNA Mini Kit	S6167-04	4x50T

❖ 适用范围:

适用于快速提取普通动物细胞和易裂解动物组织总RNA, 使用独有基因组DNA清除柱技术确保有效清除gDNA残留, 不需要使用DNase消化, RNA可直接用于反转录荧光定量PCR, Northern-blot等下游实验。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50次
裂解液 RLT Plus	室温	30 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
基因组 DNA 清除柱和收集管	室温	50套
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 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, 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. 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。

❖ 产品介绍:

本公司独家推出 EASYspin 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上, 又独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留, 得到的 RNA 不需要 DNase 消化, 可直接用于反转录 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, 然后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 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—离心等步骤, 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。

❖ 产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚, 氯仿, β 巯基乙醇等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速, 简捷, 单个细胞样品操作一般可在 15 分钟内完成。
3. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留, 得到的 RNA 不需要 DNase 消化, 可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值达 2.1-2.2 (100% 纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右, 很多公司的产品因为残留蛋白或者 DNA 较多, 造成比值降低, 无法达到 2.2 这个纯度标准, 因此降低要求 1.9-2.0 就凑合使用了, 但是本公司的产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准)。

❖ 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的台式离心机即可。
2. 样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱DA和RNA吸附柱RA处理能力，否则造成DNA残留或者产量降低。不同组织细胞种类RNA/DNA相差极大，例如胸腺脾脏DNA含量丰富，超过5mg就会超过柱子处理能力。COS细胞RNA含量丰富，超过 3×10^6 细胞就会超过柱子吸附能力。所以开始摸索实验条件时，如果不清楚样品DNA/RNA含量时宁可使用较少的样品处理量，如细胞不超过 $3-4 \times 10^6$ ，组织不超过10mg。将来根据样品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中含有盐酸胍/异硫氰酸胍化合物，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（DNase 消化也无法做到 100% 无残留），本公司的 EASYspin Plus RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术，绝大多数 DNA 已经被清除，不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR 和荧光定量 PCR。个别特殊情况如 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，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，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。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。
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 2 kb 和 1kb，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，否则提示 RNA 样品的降解。出现小的弥散片状或条带消失表明样品严重降解。但是应该注意区分是提取出来的 RNA 样品本身降解了，还是提取出来的 RNA 是完好的，只是在电泳过程中降解的。

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 100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右（100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右，很多公司的产品因为残留蛋白或者 DNA 较多，造成比值降低，无法达到 2.2 这个纯度标准，因此降低要求 1.9-2.0 就凑合使用了，但是艾德莱的产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准）。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数受测量使用的机器影响，也受测定所用稀释溶液的 pH 值影响。微量分光光度计一般不需要稀释，不受稀释溶液的 PH 值影响。但是同一个 RNA 样品，如果测量的时候机器要求稀释后测量，假定在 10mM Tris, pH7.5 稀释溶液中测出的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数 1.9-2.1 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）**

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！

1. 培养细胞

1.1 贴壁细胞：不需消化，彻底吸干净培养液体后直接加推荐量裂解液 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）直接接**操作步骤 3**；不方便直接裂解的培养容器，可以用细胞刮子刮下细胞，或者胰蛋白酶消化后吹打下来收集细胞到 1.5ml 离心管。

1.2 悬浮细胞：收集 < 10⁷ 悬浮细胞到一个 1.5ml 离心管。

- 1) 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。
- 2) 轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加 350μl (< 5 × 10⁶ 细胞) 或 600μl (5 × 10⁶ - 1 × 10⁷ 细胞) 裂解液 RLT Plus，用移液器反复吹打充分裂解（直到看不到细胞团为止）。
- 3) 将裂解混合物全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。
- 4) 立刻接**操作步骤 3**。

2. 动物组织（例如鼠肝脑）

2.1 匀浆器匀浆：新鲜组织加入 350μl (< 20mg 组织) 或者 600μl (20-30mg 组织) 的裂解液 RLT Plus 后玻璃匀浆器或电动匀浆器将组织彻底研磨匀浆。

2.2 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 Plus 的 1.5ml 离心管中，剧烈振荡 20 秒，难裂解样品可用移液器反复吹打匀浆。

注意：若研磨匀浆后不溶物碎片太多，可将匀浆后裂解物 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。将上清液加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

- 1) 将研磨均匀的匀浆液全部加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。
- 2) 立刻接**操作步骤 3**。
- 3) 立刻 13,000 rpm 离心 1 分钟，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。

3. 较精确估计滤过液体积（通常为 350μl/600μl，滤过时候损失体积应该减去，可用移液器吸取滤液估计体积），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 720μl，多可以分两次加入）加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
5. 加 700μl 去蛋白液 RW1，室温放置 30 秒，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
6. 加入 500μl 漂洗液 RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），13,000 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，放入一个干净 1.5ml 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，室温放置 1 分钟，1,3,000 rpm 离心 1 分钟得到 RNA 溶液。



洗脱缓冲液体积不应少于 30 μl ，体积过小影响回收效率。如果需要得到更大浓度的 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 μl 裂解液 RLT Plus，6cm 直径培养皿或者更大培养容器加 600 μl 裂解液 RLT Plus。最大处理量不超过 10^7 个细胞。