

# M5 HiPer Microscale Animal RNA Mini Kit

## 超微量动物 RNA 快速提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Microscale Animal RNA Mini Kit	50T	MF789-01

### 【储存条件】

**室温储存**，12个月不影响使用效果。

- 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，可在 37°C 水浴加热几分钟，恢复澄清后再使用。
- 2、不合适的储存于低温（4°C 或者 -20°C）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°C—25°C）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。

### 【产品简介】

本公司独家推出无苯酚、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 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液迅速裂解微量样品的细胞和灭活细胞 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 在高离序盐状态下选择性吸附于特制离心柱内硅基质膜，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。

### 【产品特色】

- 1、完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
- 2、快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 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 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
- 4、多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 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】

试剂盒组成	保存条件	
裂解液 RLT Plus	室温	20 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	10 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H <sub>2</sub> O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
Poly Carrier	-20°C	200µl
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
微量研磨杵	室温	3 根

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

**【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. 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。如细胞处理量不超过  $5 \times 10^5$ ，组织不超过 5mg。
3. 一般本试剂盒最小处理量可以处理 10 个以上的组织细胞。
4. 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。

**5. Poly Carrier:**

Poly Carrier 使用方法：如果起始处理量很少，我们推荐使用 Poly Carrier，如果预期有较大量 DNA 产量，用户可以根据需要选择是否加入 Poly Carrier。使用时在每个样品提取所需裂解液 RLT Plus 中加入 4 $\mu$ l Poly Carrier，将裂解液 RLT Plus 与 Poly Carrier 溶液充分颠倒混匀即可。也可根据样品数量，在总共需要的裂解液 RLT Plus 中加入总共需要的 Poly Carrier 混匀备用。混合液在室温 24 小时内稳定。

6. 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°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。）

7. 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。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。

**【操作步骤】**

**<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!>**

**<如果处理的细胞量小于 5000 个或者处理组织量小于 10 $\mu$ g 时，匀浆前请在裂解液中加入 4 $\mu$ l Poly Carrier（按照注意事项 5 指示）>**

**1. 组织培养细胞**

- a. 收集  $<5 \times 10^5$  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。
- 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 $\mu$ l (<5 $\times$ 10<sup>5</sup> 细胞) 裂解液 RLT Plus，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒充分裂解。
- d. 匀浆：(处理细胞量极少时<1 $\times$ 10<sup>5</sup> 一般不需要，涡旋振荡一分钟匀浆)。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，降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。
- e. 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)。
- f. 接操作步骤项下 3。

## 2. 动物组织 (例如鼠肝脑)

- a. 电动匀浆： <5mg 组织加入 350 $\mu$ l 裂解液 RLT Plus 后电动彻底匀浆 20-40 秒。
- b. 研磨杵+匀浆： 1.5ml 离心管内，加入 100 $\mu$ l 裂解液 RLT Plus ，加入<5mg 组织立刻用微量研磨杵研磨匀浆完全。补足裂解液 RLT Plus 到 350 $\mu$ l。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，降低粘稠度防堵塞柱子和提高产量。
- c. 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(<5mg )转入装有 350 $\mu$ l 组织裂解液 RLT Plus 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，防堵塞柱子和提高产量。
- d. 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，将裂解物上清全部加到 DNA 清除柱上(清除柱放在收集管内)。
- e. 接操作步骤项下 3。

## 3. 13,000 rpm 离心 30 秒，保留滤过液 (RNA 在滤过液中)。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (通常为 350 $\mu$ l，滤过时候损失体积应该减去) ,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 700 $\mu$ l,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。
6. 加 700 $\mu$ l 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
7. 加入 500 $\mu$ l 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 500 $\mu$ 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 RNase free 离心管中，在吸附膜的中间部位加 15-20 $\mu$ l RNase free water (事先在 70-90 $^{\circ}$ 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。

减少洗脱体积可以提高 RNA 浓度，但是 RNA 产量会降低，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。