

M5 纤维类组织 RNA 快速提取试剂盒

使用说明书 (升级版, Version2)

产品名称	单位	货号
M5 纤维类组织 RNA 快速提取试剂盒	50T	MF168-01

【升级说明】: 简化了组分, 减少了步骤, 还能对**更复杂骨组织**有较好的提取效果。

【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°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
- 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】

独特的裂解液迅速裂解纤维组织或细胞中 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 H₂O 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, 巯基乙醇等试剂。
- 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, 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】

	50T	注意事项
裂解液 RLT fibrous	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 ₂ O	10 ml	室温密闭干燥保存
RNase-Free 吸附套管	50 套	室温密闭干燥保存

【自备试剂】 无水乙醇, 异丙醇

【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. 需要自备一次性注射器, 研钵, 水浴锅等。
3. 裂解液 RLT fibrous 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 fibrous 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。)

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 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: OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数 (10mM Tris, pH7.5) 在 1.8-2.1 之间。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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 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。

【操作步骤】

- 1、将样品转移至用液氮预冷的研钵中, 用研杵研磨组织, 其间不断加入液氮, 直至研磨成粉末状。
- 2、将研磨好的组织加入到 1.5ml EP 管中加入 1ml 的 RLT fibrous 裂解液中, 立即手腕用力上下颠倒至分散均匀, 无块状物, 室温静置 2min, 使核酸蛋白复合物完全分离。
- 3、13,000rpm 离心 3min, 吸取 500ul 上清至新的 1.5EP 管中 (若 RNA 需求量比较大时, 可以吸取全部上清液, 注意, 不要吸入沉淀物, 同时, 要按比例增加异丙醇的用量)。
- 4、向上述上清液中加入 300ul 异丙醇, 手腕轻柔上下颠倒数次, 并倒入吸附柱中, 13,000rpm 离心 30s。
- 5、弃去外套管中液体, 内套管中加入 500ul 去蛋白液 RW1, 13,000 rpm 离心 30s。
- 6、弃去外套管中液体, 内套管中加入 500ul 漂洗液 RW (确定已加入无水乙醇!!), 13,000 rpm 离心 30s。再重复此过程一次。
- 7、取出内套管, 弃去外套管中液体, 仍然套回内套管, 不加洗液, 13,000 rpm 离心 2 min。
- 8、将内套管移入新的 EP 管中, 室温静置 1~2 min, 使残留乙醇挥发, 在膜中央加入 RNase-Free H₂O (洗脱液) 30~120 μl, 室温静置 1 min, 13,000 rpm 离心 2 min, 获得总 RNA。重复步骤 8, 进行二次洗脱, 可以增加核酸产量。

【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。