

FastPure RNA Cell/Tissue Mini Kit Handbook

FastPure 动物细胞/组织总 RNA 提取试剂盒说明书（单柱法）

产品组成

FastPure RNA Cell/Tissue Mini Kit			
产品编号	EK-1303-50T	EK-1303-100T	EK-1303-250T
纯化次数	50 次	100 次	250 次
Buffer RLT	40ml	80ml	220ml
Buffer RW1	32ml	64ml	176ml
Buffer RPE	12ml	24ml	60ml
RNase-free Water	10ml	20ml	50ml
RNase-free 吸附柱	50	100	250
2 ml 收集管	50	100	250
使用手册	1	1	1

产品介绍

本试剂盒可以快速地从小动物细胞中提取总 RNA。其提取的总 RNA 纯度高（存在基因组 DNA），无蛋白质及其它杂质污染，可用于 RT-PCR、qPCR、cDNA 合成、引物延伸、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、Slot Blot、Poly A 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品级化妆品等用途。

存储条件

Buffer RLT 可室温（15°C-25°C）干燥放置至少一年，加入 β-巯基乙醇的 Buffer RLT 可 4°C 放置一个月；其他试剂室温干燥保存可至少稳定 12 个月。

需要额外准备的材料

- 14.3 M β-巯基乙醇(β-ME) (常规购买商业化商品即为 14.3 M)
- 70% 乙醇: RNase-free 水配制
- 无水乙醇 (96%-100%)
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 无 RNase 酶的枪头
- 干净的手套
- 高速离心机
- 物理研磨设备

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 操作前在 Buffer RLT 中加入 β-巯基乙醇 (β-ME) 至终浓度为 1% (建议现配现用)，如 1 ml Buffer RLT 中加入 10μl β-巯基乙醇。配好的 Buffer RLT 可在 4°C 维持稳定一个月。
- Buffer RLT 在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请 37°C 加热溶解后室温使用。
- Buffer RW1 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 0.25 倍体积的乙醇 (96-100%) 以获得工作溶液。
- Buffer RPE 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 4 倍体积的乙醇 (96-100%) 以获得工作溶液。
- RNase-free 水中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染，使用时尽量注意，推荐开瓶后分装保存以减少污染风险保证实验稳定性。
- RNA 在 Buffer 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 的无酶离心管或玻璃器皿。

操作步骤:**1. 请根据样品种类进行以下步骤 (1a 为动物细胞, 1b 为动物组织)**

1a. 收集动物细胞: 悬浮细胞可直接 300×g 离心 5min 并仔细吸除上清留沉淀待使用; 单层贴壁细胞可通过直接裂解法 (吸尽培养基留下贴壁细胞, 待步骤 2 用 Buffer RLT 裂解) 或胰酶处理法 (吸尽培养基留下贴壁细胞, 用 PBS 清洗细胞, 吸除 PBS 后使用含 0.10%-0.25%胰酶的 PBS 使细胞脱落, 加入含有血清的培养基使胰酶失活后转入 1.5ml 无酶离心管中 300×g 离心 5min, 吸除上清留沉淀待使用)

注意: 收集细胞数量不要超过 1×10^7 , 收集细胞时一定要将细胞培养基去除干净, 否则会导致步骤 2 时细胞裂解不完全, 影响 RNA 与吸附柱的结合, 导致 RNA 的产量降低。

2b. 动物组织匀浆裂解处理: 将 10mg-30mg 动物组织转移入 1.5ml 无酶离心管中并加入 600μl Buffer RLT (动物组织量不要超过 30mg) 使用前请检查 Buffer RLT 是否加入 β-巯基乙醇, 使用研磨杵或电动研磨机将动物组织彻底研磨匀浆。直接进行步骤 3。

匀浆时间根据样本裂解难易程度决定, 亦可匀浆后静置 3-5min 延长裂解时间 (期间颠倒吹匀 2-3 次)。

2. 样品裂解: 对于 1a 中使用直接裂解法的细胞应在培养皿或培养瓶中直接加入 600μl Buffer RLT (使用前请检查 Buffer RLT 是否加入 β-巯基乙醇) 进行细胞裂解, 之后将裂解液全部吸入 1.5ml 无酶离心管中进行下一步操作。对于 1a 中使用胰酶处理法的细胞应在无酶离心管中加入 600μl Buffer RLT 涡旋 1min 裂解并进行下一步操作

若细胞量少于 5×10^6 可使用 350μl Buffer RLT。若细胞量较大, 可涡旋后静置 3-5min 延长裂解时间 (期间颠倒吹匀 2-3 次)。

3. 将无酶离心管放入高速离心机以最大转速 (~13,400×g) 离心 3min。收集上清入新的 1.5ml 无酶离心管中, 并加入 1 倍体积的 70% 乙醇混匀。如 600μl 溶液则加入 600μl 70% 乙醇。

配制 70% 乙醇时请使用 RNase-free water。

4. 将步骤 3 混匀后的溶液转移入 RNase-free 吸附柱中并套上 2ml 收集管,

≥8000×g (≥10,000 rpm) 离心 30s, 弃废液。

吸附柱最大上柱量为 700μl, 若溶液过多可分多次上柱。后续操作若无特殊说明吸附柱均置于 2ml 收集管中。

5. 向吸附柱中加入 700μl Buffer RW1 (使用前请确认 Buffer RW1 是否按要求加入 0.25 倍体积无水乙醇), ≥8000×g (≥10,000 rpm) 离心 30s, 弃废液。

6. 向吸附柱中加入 500μl Buffer RPE (使用前请确认 Buffer RPE 是否按要求加入 4 倍体积无水乙醇), ≥8000×g (≥10,000 rpm) 离心 30s, 弃废液。

7. 重复步骤 6 一次。

8. 倒弃滤液, 将吸附柱放入收集管中, 以最大转速 (~13,400×g) 离心 3min 干燥柱膜。

9. 将吸附柱套入新的无酶 1.5ml 离心管中, 并置于无酶的环境中开盖静置 5-10min 至乙醇晾干。

若吸附柱中残留乙醇将会对纯化后的 RNA 的下游实验造成影响。

10. 向吸附柱膜正中央加入 50-100μl RNase-free Water, 盖上盖子室温静置 3-5 min。后置于离心机中 ≥12,000×g (≥13,000 rpm) 离心 3min 得到 RNA 溶液。

RNA 洗脱体积不应少于 30μl, 否则影响洗脱效率。洗脱后的 RNA 溶液应置于 -80°C 储存。

RNA 纯度及浓度检测

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 读数在 1.8-2.1 之间, 比值为 2.0 是高质量 RNA 的标志。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 10 mM 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 ddH₂O 稀释 n 倍, 用 RNase-free ddH₂O 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:

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD260}) \times (\text{稀释倍数 } n) \times 40$$