

# Biomarker Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit

## ◆ 产品介绍

本试剂盒使用独特的裂解液和独特基因组DNA清除柱技术：独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞RNA酶，然后将裂解混合物通过基因组DNA清除柱，清除基因组DNA，滤过的RNA在使用乙醇调节结合条件后，在高离子盐状态下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—离心的步骤，在去蛋白液和漂洗液作用下将细胞代谢物，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。

适用于快速提取普通动物细胞和易裂解动物组织总RNA，使用独特的基因组DNA清除柱技术能有效清除gDNA残留，RNA可直接用于RT-PCR、qPCR、普通转录组测序、全长转录组测序等多种下游实验。

## ◆ 试剂盒组成

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 <sub>2</sub> O	室温	5 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
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

本试剂盒可在室温储存12个月不会影响使用效果

## ◆ 储存事项:

- 1.所有的试剂是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，可在37℃水浴加热几分钟，恢复澄清后即可使用。
- 2.试剂的运输和储存均在室温下（15℃—25℃）进行，低温（4℃或者—20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果。
- 3.避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH值变化，各溶液使用后需及时盖紧盖子。

## ◆ 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3x10<sup>6</sup>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3-4x10<sup>6</sup>，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。
  - 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。

## ◆ 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

A1. 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。

A2. 悬浮细胞: 收集 $<10^7$ 悬浮细胞到一个1.5ml离心管。

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. 轻弹离心管底部, 使细胞沉淀松散, 加 $350\mu\text{l}$  ( $<5\times 10^6$ 细胞) 或 $600\mu\text{l}$  ( $5\times 10^6$  -  $1\times 10^7$ 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。

D. 将裂解混合物全部加到DNA清除柱上(清除柱放在收集管内)。

E. 立刻接操作步骤3。

### 2.动物组织(例如鼠肝脑)

A1. 匀浆器匀浆: 新鲜组织加入 $350\mu\text{l}$  ( $<20\text{mg}$ 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; 如果组织大于 $20\text{mg}$ , 需匀浆后把组织裂解液补充至 $600\mu\text{l}$ 。

A2. 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( $20\text{mg}/30\text{mg}$ )转入装有 $350\mu\text{l}/600\mu\text{l}$ 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)。

B. 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)。

C. 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。

4.较精确估计滤过液体积(通常为 $350\mu\text{l}/600\mu\text{l}$ , 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。

5.立刻将混合物(每次小于 $720\mu\text{l}$ , 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 $700\mu\text{l}$  去蛋白液RW1, 室温放置30秒, 13,000rpm 离心30秒, 弃掉废液。

7.加入 $500\mu\text{l}$ 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 $500\mu\text{l}$ 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 $30$ - $50\mu\text{l}$  RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$ , 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 $30\mu\text{l}$ , 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 <sup>2</sup> )	加培养液量(ml)	可获细胞量
24孔培养板	2	1.0	$5 \times 10^5$
6孔培养板	9.6	2.5	$2.5 \times 10^6$
3.5cm培养皿	8	3.0	$2.0 \times 10^6$
6cm培养皿	21	5.0	$5.2 \times 10^6$
25cm塑料培养瓶	25	5.0	$5.2 \times 10^6$
100ml玻璃培养瓶	33	10.0	$7 \times 10^6$

注：一般情况下，3.5cm直径培养皿或者更小培养容器加350  $\mu$ l裂解液RLT Plus，6cm直径培养皿或者更大培养容器加600  $\mu$ l裂解液RLT Plus。最大处理量不超过 $10^7$ 个细胞。

## 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2kb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（特殊的软体动物、节肢动物等除外）。出现小的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 H<sub>2</sub>O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OD260, OD280测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：终浓度 (ng/ $\mu$ l) = (OD260) × (稀释倍数n) × 40。