

Imagene®

GenePure Fibrous Tissue RNA Kit
GenePure 纤维类组织 RNA 快速提取试剂盒

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

GenePure 纤维类组织 RNA 快速提取试剂盒

目录号 RE118

使用说明书

网站: www.codonx.com

咨询电话: 010-56315162

技术支持 QQ: 3090544158

1/适用范围

2/试剂盒组成、储存、稳定性

3/储存事项

4/产品介绍

5/产品特点

6/注意事项

7/操作步骤

1/适用范围:

适用于快速提取心脏、骨骼肌、血管、气管、皮肤和其它纤维丰富的组织RNA。

2/试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	20 次 (RE118-01)	50 次 (RE118-02)
裂解液 LBT	室温	20ml	50 ml
去蛋白液 PRS	室温	15 ml	40 ml
漂洗液 RB	室温	5 ml	10ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	20 ml	40 ml
蛋白酶 K 粉 40mg/ml	-20℃	10mg	20mg
RNase-free 吸附柱 AC 和收集管 CT	室温	20 套	50 套

本试剂盒在室温储存 6 个月不影响使用效果。

3/储存事项:

- 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。
- 不合适储存于低温（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。
- 为避免降低活性，方便运输，提供**蛋白酶 K 为冻干粉状**，收到后，可短暂离心后，加入 **0.25ml（20 次）和 0.5ml（50 次）RNase-free H₂O 溶解**。因为反复冻融可能会降低酶活性，因此溶解后可立即按照每次使用量分装冻存，-20℃ 保存。
- 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。

4/产品介绍:

独特的裂解液/β-巯基乙醇迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后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。

5/产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用世界著名公司特制吸附膜，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，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
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。

6/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。
2. 需要自备乙醇，β-巯基乙醇，一次性注射器，研钵，水浴锅等。
3. 裂解液LBT 和去蛋白液PRS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LBT 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,本公司的 GenePure 系列 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择

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 PRS 漂洗前,直接在吸附柱 AC 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: OD_{260}/OD_{280} 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA, OD_{260}/OD_{280} 读数(10mM Tris, pH7.5)在 1.8-2.1 之间。 OD_{260}/OD_{280} 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 OD_{260}/OD_{280} 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 OD_{260} , OD_{280} 测定,按照以下公式进行 RNA 浓度的计算: 终浓度 (ng/μl) = (OD_{260}) × (稀释倍数 n) × 40。

7/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 RB 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇!
- ⇒ 操作前在裂解液 LBT 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml LBT 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的裂解液 LBT 4℃可放置一个月。

1. 充分破碎匀浆（非常重要，否则严重降低产量）

a. 电动破碎匀浆（首选强烈推荐，产量最高结果最稳定）：取约 10-20mg (<30mg) 新鲜组织，加入 300 μ l 裂解液 LBT 后用电动刀片匀浆机（Rotor-Stator 如 TissueRupter）或者电动玻珠研磨机（Bead Mill 如 TissueLyser）按照机器使用说明彻底破碎匀浆组织细胞。

b. 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 10-20mg (<30mg) 转入装有 300 μ l 裂解液 LBT 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,降低粘稠度和提高产量。讲匀浆转入新离心管。

c. 研钵研磨匀浆：取适量组织细粉 10-20mg (<30mg) 放入小研钵后，迅速加入 300 μ l 裂解液 LBT 后直接室温充分研磨匀浆。将匀浆转入新离心管。

注意：如果匀浆沾在研钵内损失比较大，可以按照比例适当提高起始组织用量和裂解液 LBT 用量。此外，也可以先用液氮研磨组织成细粉，然后液氮刚刚蒸发完的时候加入裂解液 LBT 充分研磨匀浆，可以提高研磨效果。

2. 吸取 590 μ l RNase-free H₂O 至匀浆中。加入 10 μ l 蛋白酶 K，移液器吹打混匀。
3. 55℃下水浴 10 分钟。
4. 室温下以 13, 000rpm 离心 5 分钟。这样将会形成小量的组织碎片沉淀，而且在上清的顶部可能看见少量的漂浮物。
5. 转移上清至一个新的 1.5ml 离心管中。

注意：转移时不要带入沉淀物，而且移液枪头必须放在上清漂浮物之下。漂浮物通常会黏附在枪头的外壁，注意不能将其带入离心管中。

6. 较精确估计裂解物(上清)体积，加入 0.5 体积的无水乙醇（一般为 450 μ l），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。

- 立刻将混合物(每次小于 700μl，可以分两次加入)加入同一个吸附柱 AC 中，(吸附柱 AC 放入**收集管 CT**中) 13,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
- 加 700μl 去蛋白液 PRS，室温放置 30 秒，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

如果 DNA 残留明显,可在加入去蛋白液 PRS 后室温放置 5 分钟再离心。

- 加入 500μl 漂洗液 RB (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 500μl 漂洗液 RB，重复一遍。
- 将吸附柱 AC 放回空**收集管 CT**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。
- 取出吸附柱 AC，放入一个 RNase free 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 (事先在 70-90℃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。
- 可选：使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液 RNA 浓度可以适当提高一些。如果预期 RNA 产量 > 30μg，可加 30-50μl RNase free water 重复步骤 11，合并两次洗脱液，可以提高产量 15-30%，但浓度会有所降低。

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com

