



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

GREENspin 组织/细胞RNA快速提取试剂盒

(目录号: ZP409)

ZOMANBIO

为生命科学研究探索提供每一款好的产品

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

Order: 010-6261-7225

Free Phone: 400-611-2007

Technical: 010-6297-9301

Fax: 010-6296-8805

Email: zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

实验室使用，仅用于科研
北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

目录编号	包装单位
ZP409-01	50次
ZP409-02	100次

■ 适用范围：

适用于快速提取各种细胞组织总RNA

■ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50次	100次
裂解液RLT	室温	50ml	100 ml
去蛋白液RW1	室温	40 ml	80 ml
漂洗液RW	室温	15ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	15ml*2 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	10 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前按说明加指定量乙醇	18ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free 吸附柱RA和收集管	室温	50套	100套

本试剂盒在室温储存12个月不影响使用效果。

■ 储存事项：

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，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。

■ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口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。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
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。

■ 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. 需要自备乙醇，β-巯基乙醇，一次性注射器，研钵。

3. 裂解液RLT 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 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,本公司的GREENspin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（10mMTris, 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：（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!

→ 操作前在裂解液RLT中加入β-巯基乙醇至终浓度1%，如1 ml RLT 中加入10μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RLT 4°C可放置一个月。

1. 组织培养细胞

a. 收集<107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**，加入350μl（<5x10⁶细胞）或者600μl（5x10⁶-1x10⁷细胞）裂解液RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡20秒，充分裂解。

d. 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,降低粘稠度和提高产量。

e. 接操作步骤项下3。**2. 动物组织（例如鼠肝脑）**

a. **电动匀浆：**新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块,加入350μl(<20mg组织)或者600μl(20-30mg组织)的裂解液RLT后电动彻底匀浆20-40秒。

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(20mg/30mg)转入装有350μl/600μl组织裂解液RLT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。

c. 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,将裂解物上清小心转到一个新离心管。

d. 接操作步骤项下3。

3. 较精确估计裂解物(上清)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。

4. 立刻将混合物(每次小于700μl,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60秒，弃掉废液。

5. 加700μl 去蛋白液RW1，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RW1后室温放置5分钟再离心。

6. 加入500μl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500μl漂洗液RW,重复一遍。

7. 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。

8. 取出吸附柱RA，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°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。

9. 如果预期RNA产量>30μg,加30-50μl RNase free water重复步骤8,合并两次洗脱液,或者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洗脱液浓度高,分两次洗脱合并洗脱液的RNA产量比前者高15-30%,但是浓度要低,用户根据需要选择。