

# FastPure RNA Cell/Tissue Mini Kit Handbook

## FastPure 动物细胞/组织总 RNA 提取试剂盒说明书

### 产品组成

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

室温干燥保存可至少稳定 12 个月。

### 需要额外准备的材料

- 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。

- 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。
- 若处理 RNase 含量丰富的组织如肝脏/胰腺/肾脏/脾脏，建议在 Buffer RLT 中加入 β-巯基乙醇（或 DTT 溶液亦可），如 1 mL Buffer RLT 中加入 10μL β-巯基乙醇（或 40μL 1M DTT 溶液亦可）。

**操作步骤:****1. 样本准备与裂解: 请根据样品种类选择以下处理方式****1a. 动物细胞 (离心收集法): 适用于悬浮细胞或经胰酶处理脱落的贴壁细胞。**

① 将细胞 (不超过  $1 \times 10^7$  个) 转入离心管,  $300 \times g$  离心 5 min, 彻底弃除上清。

② 加入 PBS 重悬细胞清洗一次, 再次离心弃净上清。

③ 向细胞沉淀中加入 600 $\mu$ L Buffer RLT (细胞数  $< 5 \times 10^6$  时可用 350 $\mu$ L), 涡旋或吹打至无肉眼可见细胞团块, 进行步骤 2。

注: 若裂解后有明显沉淀, 请最大转速离心 2 min, 取上清进行步骤 2。

**1b. 动物细胞 (皿内直接裂解法): 适用于贴壁牢固的细胞, 可有效减少 RNA 降解。**

① 吸尽培养基, 用 PBS 清洗 1-2 次并彻底吸干残留液体。

② 直接向皿中加入 600 $\mu$ L Buffer RLT, 涡旋或吹打至无肉眼可见细胞团块。

③ 将裂解液全部转移至新的无酶 1.5 mL 离心管中, 进行步骤 2。

注: 若裂解后有明显沉淀则最大转速离心 2min, 取上清。

**1c. 动物组织:**

① 取 10-30 mg 组织 (切勿超过 30 mg) 移入离心管, 加入 600 $\mu$ L Buffer RLT。

② 使用电动研磨机或研磨杵彻底匀浆 (组织必须完全粉碎)。

③ 最大转速 ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心 3 min, 小心吸取澄清的上清液转移至新管进行步骤 2。

注: 吸取上清时切勿触碰管底沉淀, 以免堵塞吸附柱或污染基因组 DNA。

**2. 向上述所得裂解液 (细胞裂解液或组织离心上清) 中加入 1 倍体积的 70% 乙醇 (使用 RNase-free water 配制), 立即用移液器吹打混匀。**

注意: 混匀后可能会出现丝状沉淀, 请勿离心。务必将混匀液 (含沉淀) 全部转移至吸附柱中。

**3. 将步骤 2 混匀后的溶液转移入 RNase-free 吸附柱中并套上 2mL 收集管,  $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$  离心 30s, 弃废液。**

吸附柱最大上柱量为 700 $\mu$ L, 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。

**4. 向吸附柱中加入 700 $\mu$ L 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),  $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$  离心 30s, 弃废液。

**5. 向吸附柱中加入 500 $\mu$ L 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),  $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$  离心 30s, 弃废液。****6. 重复步骤 5 一次。****7. 倒弃滤液, 将吸附柱放入收集管中, 以最大转速 ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心 3min 干燥柱膜。****8. 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。

**9. 向吸附柱膜正中央加入 30-100 $\mu$ L RNase-free Water, 盖上盖子室温静置 1-3 min。后置于离心机中  $\geq 12,000 \times g (\geq 13,000 \text{ rpm})$  离心 2min 得到 RNA 溶液。**

RNA 洗脱体积不应少于 30 $\mu$ L, 否则影响洗脱效率。洗脱后的 RNA 溶液应置于  $-80^\circ\text{C}$  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 ddH<sub>2</sub>O 稀释 n 倍, 用 RNase-free ddH<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:

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