



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// [www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: [real-times@vip.163.com](mailto:real-times@vip.163.com)

## RealPure Animal Tissues/Cell RNA Extraction Kit

### RealPure 动物组织/细胞 RNA 提取试剂盒

#### ● 试剂盒内容及保存:

试剂盒组成	RTR2306-01 (50次)	贮存方式
裂解液 RL	30 ml	常温
去蛋白液 RD	30 ml	常温
漂洗液 RW (浓缩液)	25 ml 首次使用按照标签加入无水乙醇	常温
RNase-free 水	5 ml	4°C
DNA 清除柱 CS (RNase-free)	50 个	常温
RNA 吸附柱 CR (RNase-free)	50 个	常温
收集管	100 个	常温
2 ml 离心管 (RNase-free)	50 个	常温
1.5 ml 离心管 (RNase-free)	150 个	常温
说明书	1 份	

#### ● 储存条件和效期:

RNase-free 水 4°C 贮存; 其他试剂在常温 (25°C 左右) 干燥条件下, 可保存 1 年。试剂盒常温运输。

#### ● 产品简介:

本试剂盒可从动物组织中快速提取总 RNA, 可同时处理大量不同样品。提取的总 RNA 纯度高, 没有蛋白和其它杂质的污染, 可用于 RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

#### ● 准备工作:

- 1 操作前在裂解液 RL 中加入  $\beta$ -巯基乙醇 (自备, 试剂盒不提供) 至终浓度 1%, 如 1 ml RL 中加入 10  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RL 4°C 可放置 3 天。
- 2 按照标签所示在漂洗液 RW 中加入无水乙醇 (自备), 混匀后盖紧瓶盖后常温贮存备用。
- 3 所有离心步骤均在常温下进行。

#### ● 操作步骤:

##### 1. 样品处理和裂解:

###### 1.1 贴壁细胞:

###### 1.1.1 直接裂解法:

不需胰酶消化, 彻底吸干净培养液体后直接加推荐量裂解液 RL (使用前请先检查是否已加入  $\beta$ -巯基乙醇) (下表) 反复吹打细胞裂解, 可以漩涡震荡, 直到看不到细胞团为止, 进行步骤 2。

培养器皿	底面积 (cm <sup>2</sup> )	加培养液量 ml	可获细胞量	裂解液 RL 加入体积
24 孔培养板	2	1	5×10 <sup>6</sup>	350 μl
3.5cm 培养皿	8	3	2×10 <sup>6</sup>	350 μl
6 孔培养板	9.6	2.5	2.5×10 <sup>6</sup>	600 μl
6cm 培养皿	21	5	5.2×10 <sup>6</sup>	600 μl
25cm 培养皿	25	5	5.2×10 <sup>6</sup>	600 μl
100ml 玻璃培养瓶	33	10	7×10 <sup>6</sup>	600 μl

### 1.1.2 胰蛋白酶消化法:

确定细胞数量(收集细胞数量请不要超过  $1 \times 10^7$ ),吸除培养基,用 PBS 洗涤细胞,吸除 PBS,向细胞中加入胰酶消化液处理细胞,当细胞脱离容器壁时,加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶,将细胞溶液转移至 1.5 ml 离心管中,  $300 \times g$  离心 5 min,收集细胞沉淀,仔细吸除所有上清,加 350 μl ( $<5 \times 10^6$  细胞)或 600 μl ( $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  细胞)裂解液 RL (使用前请先检查是否已加入 β-巯基乙醇),反复吹打细胞裂解,可以漩涡震荡,直到看不到细胞团为止,进行步骤 2。

### 1.2 悬浮细胞:

$300 \times g$  离心 5 min 收集悬浮细胞(收集细胞数量请不要超过  $1 \times 10^7$ )到一个 1.5ml 离心管中,完全吸弃上清,加 350 μl ( $<5 \times 10^6$  细胞)或 600 μl ( $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  细胞)裂解液 RL (使用前请先检查是否已加入 β-巯基乙醇),反复吹打细胞裂解,可以漩涡震荡,直到看不到细胞团为止,进行步骤 2。

### 1.3 动物组织:

新鲜组织加入 350 μl( $<20$ mg 组织)或者 600 μl( $20$ - $30$ mg 组织)的裂解液 RL (使用前请先检查是否已加入 β-巯基乙醇)后玻璃匀浆器或电动匀浆器将组织彻底研磨匀浆,进行步骤 2。

注意:组织量一定不要超过 30 mg,否则将导致 RNA 得率和质量下降。

**背景知识:** 样品处理量绝对不要超过 DNA/RNA 吸附柱处理能力,否则造成 DNA/RNA 残留或者产量降低。不同组织细胞种类 DNA/RNA 相差极大,例如胸腺脾脏 DNA 含量丰富,超过 5 mg 就会超过柱子处理能力。COS 细胞 RNA 含量丰富,超过  $3 \times 10^6$  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  $3$ - $4 \times 10^6$ ,组织不超过 10mg,随后根据实验结果增加或者减少处理量。

## 2. 离心得到上清:

若没有不溶性沉淀,直接进行步骤 3。如有不能裂解的碎片或者不溶物,13,000 rpm 离心 5 min,取裂解物上清进行下一步。

## 3. 去除基因组污染和洗脱 RNA:

将 DNA 清除柱 CS 放入一干净的 2 ml 离心管内,用移液器小心将步骤 1 离心管内的溶液或步骤 2 离心后的上清全部转移到 DNA 清除柱 CS 中,13,000 rpm 离心 2 分钟 (RNA 在离心管滤液中,不要丢弃)。

注:确保全部溶液都收集到 2 ml 离心管中,如果膜上有残留液体,延长离心时间至 5 分钟,保证膜上无残留液体。

## 4. RNA 挂柱:

向 2 ml 离心管滤液中加入 0.5 倍体积的无水乙醇(如滤液体积为 300 μl/600 μl,加入 150 μl/300 μl 无水乙醇),此时可能会出现沉淀,立即混匀,不要离心。将全部溶液加入到 RNA 吸附柱 CR 中(吸附柱放入收集管中),13,000 rpm 离心 1 分钟。

注：确保溶液全部过滤到收集管中，膜上无残留，如有必要，可以延长离心时间至 5 分钟。

#### 5. 去除 RNA 中的蛋白污染：

向 RNA 吸附柱 CR 中（吸附柱放入收集管中）加入 500  $\mu$ l 去蛋白液 RD，13,000 rpm 离心 1 分钟，弃废液。

#### 6. 去除 RNA 中的其他杂质：

向 RNA 吸附柱 CR 中加入 700  $\mu$ l 漂洗液 RW（使用前请先检查是否已加入乙醇），13,000 rpm 离心 1 分钟，弃废液。

#### 7. 进一步去除 RNA 中的其他杂质：

向吸附柱 CR 中加入 500  $\mu$ l 漂洗液 RW（使用前请先检查是否已加入乙醇），13,000 rpm 离心 1 分钟，弃废液。

#### 8. 关键步骤：彻底去除吸附柱上的残余乙醇：

将吸附柱 CR 放回收集管中，确保盖好吸附柱管盖，13,000 rpm 将吸附柱 CR 空甩离心 2 分钟，去除吸附柱上的残余液体。

注：此步骤目的是将吸附柱中残余漂洗液去除，如果有漂洗液残留，可能会影响后续的 RT 等实验操作。

#### 9. 洗脱得到 RNA：

将 RNA 吸附柱 CR 转入一个新的 1.5 ml RNase-free 离心管中，向吸附柱 O 型垫圈中央悬空加入 50-100  $\mu$ l RNase-free 水（事先 65 $^{\circ}$ C 预热可提高洗脱效率），盖好吸附柱管盖，常温放置 2 分钟，13,000 rpm 离心 2 分钟。

注：确保水要加到膜的中央，不要贴壁加入；洗脱缓冲液体积不应少于 50  $\mu$ l，体积过小影响回收效率。

#### 10. RNA 贮存：

RNA 样品-80 $^{\circ}$ C 中保存。

#### ● RNA 产量和质量的评估：

##### 1. RNA 产量：

用分光光度计测定 OD<sub>260</sub> 的吸光值来计算 RNA 产量。将 RNA 按照一定的比例稀释于 TE 溶液（10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA）中，根据以下公式计算：

$$A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 = \mu\text{g RNA/ml}$$

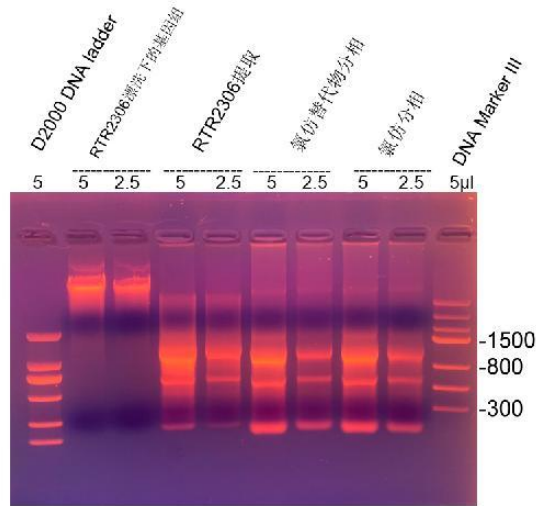
注：测定 OD 值时，尽量不要用 RNase-free 水稀释 RNA，因为 RNase-free 水 pH 较低，测定的 OD 值偏低。

##### 2. RNA 质量：

凝胶电泳检测：凝胶电泳中，动物的完整 RNA 应该有两条主带：28S 和 18S，并且 28S 亮度应该与 18S 相当或是其亮度的 2 倍。可以使用普通的 1 $\times$ TAE 琼脂糖凝胶电泳，凝胶浓度 1-1.5%，可以使用高电压，短时间电泳，如 7V/cm 电泳，20 分钟。建议使用 D2000 DNA ladder（Cat: RTM415）作为 Marker。28S rRNA 迁移率与 1800bp 类似，18S rRNA 迁移率与 700bp 类似。

吸光值检测：可以用 A<sub>230</sub>，A<sub>260</sub> 和 A<sub>280</sub> 的数值表示 RNA 的纯度。纯净的 RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值应该为 2，我们得到的 RNA 样品比值应在 1.8-2.2 之间，如果比值低于 1.8，表明 RNA 样品中蛋白污染比较严重。A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> 比值应该在 2-2.2 之间。如果此比值低于 2，表明 RNA 样品中有胍盐的污染。

## ● 实验示例:



1.2%琼脂糖胶 1×TAE 150V 25min RealSafe Red 预染

RNA 提取试剂提取步骤: K562 悬浮细胞, 1 ml 收集 ( $6 \times 10^6/\text{ml}$ ), PBS 漂洗两遍, 加入 1 ml RNA 提取试剂, 悬浮后常温静置 10 分钟, 加入氯仿或氯仿替代物 200  $\mu\text{l}$ , 彻底混匀后静置 10 分钟, 自然分相, 4 度 13000 rpm 离心 15 分钟, 上清中加入等体积异丙醇, 常温静置 20 分钟, 4 度 13000 rpm 离心 15 分钟, 沉淀用 1 ml 75%乙醇漂洗, 4 度 8000rpm 离心 2 分钟, 沉淀溶于 50 $\mu\text{l}$  RNase-free 水中。

RTR2306 操作简述如下: K562 悬浮细胞, 1ml 收集 ( $6 \times 10^6/\text{ml}$ ), PBS 漂洗两遍 (平行做 2 管)。沉淀中加入 350  $\mu\text{l}$  裂解液 RL (已加  $\beta$ -ME), 常温裂解 5 分钟, 裂解物加到 DNA 清除柱 CS 中, 离心收集到 2 ml 离心管中, 离心管中加入 0.5 倍体积无水乙醇, 全部溶液加到 RNA 吸附柱 CR 中, 离心, 随后清除柱 CS 和 RNA 吸附柱 CR 一次 RD 漂洗, 2 次 RW 漂洗, 最后每个吸附柱用 50  $\mu\text{l}$  RNase-free 水洗脱, 合并两管得到 100  $\mu\text{l}$  RNA 和 100  $\mu\text{l}$  去除的基因组 DNA。

## ● 问题指南:

### 1. 离心柱发生堵塞

离心柱发生堵塞之后会造成 RNA 得率降低甚至不能纯化得到 RNA。

常见原因分析如下:

#### 1.1 组织或细胞破碎不彻底。

破碎不彻底会使吸附柱发生堵塞, 同时会影响 RNA 得率及质量。我们建议在进行裂解时, 尽量借助辅助手段如机械匀浆彻底破碎组织。

#### 1.2 样本初始量过多。

样本使用量过多会导致裂解液 RL 裂解细胞时不完全, 导致离心柱堵塞。该试剂盒处理样本的初始最大量  $10^7$  细胞或 30 mg 组织。

#### 1.3 离心机的温度过低。

整个 RNA 分离纯化所有的步骤均在常温 (20-25 $^{\circ}\text{C}$ ) 进行。有些低温离心机的温度低于 20 $^{\circ}\text{C}$ , 可能会造成离心柱的堵塞。如果发生这种现象, 请将离心机温度设置到 20-25 $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2. 提取不到 RNA 或者 RNA 产量低

通常会有多种因素影响回收效率, 比如: 样本 RNA 含量、操作方法、洗脱体积等。

常见原因分析:

#### 2.1 样本保存不当或样本保存时间过久导致 RNA 已经降解。

建议：新采集的样本应立即放入液氮中速冻，长期保存于-70°C并避免样本的反复冻融；或者将样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNAwait 溶液中。

## 2.2 样本破碎裂解不充分导致纯化柱堵塞。

建议：参见 1。

## 2.3 洗脱液添加不正确。

建议：确认 RNase-Free 水滴加到了纯化柱膜 O 型垫圈中央位置。

## 2.4 漂洗液 RW 中没有添加正确体积的无水乙醇。

建议：请按照说明书，在试剂盒使用前，漂洗液 RW 中添加正确体积的无水乙醇并混匀。

## 2.5 组织样本用量不合适。

建议：每 600  $\mu$ l 裂解液 RL 使用最大细胞量为  $1 \times 10^7$ ，使用最大组织量为 30 mg，过多会导致 RNA 提取量降低并且得到的 RNA 纯度也会降低。我们强烈建议每单次 RNA 提取操作，样本初始用量一定不要超过最大建议量。

## 2.6 洗脱体积不合适或洗脱不彻底。

建议：纯化柱的洗脱液体积为 50-100  $\mu$ l；若洗脱效果并不理想，建议在加入 65°C 预热的 RNase-Free 水后，延长常温放置的时间，例如放置 5-10 min。

## 2.7 纯化柱在第二次 RW 洗涤之后有乙醇残留。

建议：漂洗液 RW 洗涤后，吸附柱空甩离心 2 min 是关键步骤，以充分除去吸附柱上残留的乙醇。

## 3. 纯化获得的 RNA 有降解

纯化得到的 RNA 的质量和样本的保存、RNase 污染、操作等因素有关。

常见原因分析：

### 3.1 组织样本采集后没有及时保存。

建议：组织样本在收集后若不及时使用，请立即低温保存于液氮中或经液氮速冻后立即转移至-70°C 长期保存，或者将样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNAwait 溶液中。提取 RNA 请尽量使用新近采取的组织样本。

### 3.2 组织样本反复冻融。

建议：组织样本保存时，最好分装成小份，使用时取出其中一份即可，避免样本的反复冻融导致 RNA 的降解。

### 3.3 操作间有 RNase 引入或没有佩戴一次性手套、口罩等。

建议：RNA 提取实验最好在单独的 RNA 操作间进行，并在实验前清理好实验桌，实验时佩戴一次性手套、口罩，最大程度上避免 RNase 引入导致的 RNA 降解。

### 3.4 试剂在使用过程中被 RNase 污染。

建议：更换新的提取试剂盒进行相关实验。

### 3.5 RNA 操作时所用的离心管、枪头等有 RNase 污染。

建议：确认 RNA 提取时所用到的离心管、枪头、移液器等都是 RNase-Free。

## 4. RNA 中含有 DNA 污染

### 4.1 提取的起始材料量超过最大建议量

建议：步骤 1-样品处理时使用  $10^7$  细胞或 30 mg 组织，不要超过最大处理量，否则样品的核酸量会超过 DNA 清除柱 CS 的处理极限，导致洗脱下的 RNA 有基因组 DNA 的污染。

### 4.2 省略了步骤 3-去除基因组污染步骤。

建议：步骤 3-去除基因组污染步骤必不可少，不能省略。DNA 清除柱 CS 能最大限度的去除上清液中的基因组 DNA，使用裂解液 RL 洗脱下的 RNA 基本无基因组 DNA 的污染。

#### 4.3 跳过了使用去蛋白液 RD 的漂洗步骤（见操作步骤第 5 步）。

建议：这一步骤对于除去残留的 DNA 以及杂质蛋白十分重要，一定不能省略，否则将会导致纯化得到的 RNA 中含有 DNA 污染和蛋白污染。

#### 5. 纯化获得的 RNA 影响下游实验

经吸附柱纯化的 RNA，如果盐离子、蛋白质含量过多会影响下游实验，比如：逆转录、Northern Blot 等。

##### 1. 洗脱后的 RNA 有盐离子残留。

建议：确认漂洗液 RW 中添加了正确体积的乙醇，并按操作说明的离心转速进行 2 次 RW 洗涤吸附柱（见操作步骤第 6，7 步）。

##### 2. 洗脱后的 RNA 有乙醇残留。

建议：确认 RW 第二次洗涤后，按操作说明的对吸附柱进行空管离心操作（见操作步骤第 8 步），如果还有乙醇残留，可以将空管离心后吸附柱开盖常温放置 5 min，以最大程度上去除乙醇残留。