

3. 预防 RNase 污染, 在实际的操作中应遵循以下指南 (参见《分子克隆》)

- * 全程佩戴一次性手套。皮肤经常带有细菌和霉菌, 可能污染RNA的抽提并成为RNA酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。
- * 使用灭菌的、一次性的塑料器皿和自动吸管抽提RNA, 避免使用公共仪器所导致的RNA酶交叉污染。
- * 使用无 RNA 酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在 150° C 的烘箱中烘烤 4 小时, 塑料器皿可以在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟, 用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。

4. 考虑到环保问题, 本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿, 用户使用前需要自备氯仿。

5. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析 RNA 的质量。好的 RNA 产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体 RNA 带, 分别为~5Kb (28S), ~2Kb (18S), 条带亮度比值约为 2: 1。有时候也可以看到~0.1kb 和 0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到 4, 5 条带也属于正常现象, 如果 RNA 未成熟的前体或者不均一核 RNA、小核 RNA 提取出来也可能看到介于 7Kb 和 15Kb 之间的不连续的高分子量条带。

6. 检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 吸光度比值时, RNA 样品应该溶于 TE 后检测, 如果用水稀释后检测, 由于一般水离子强度和 PH 值低, 会使 OD₂₈₀ 升高, 从而使比值降低。

7. 加入裂解液 RLS 匀浆后, 加氯仿前, 样品可在 -60°C-70°C 保存一个月以上。

五、操作步骤

- * 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乙醇!
- * 第一次使用前请先在 carrier 中加入指定量无酶水!

1. 匀浆处理

a. 生物液体

每0.25ml液体样品(血清, 血浆, 脑脊液等等)加入0.75ml RLS和6ul的carrier助沉剂, 用加样枪吹打液体样品几次以帮助裂解样品中细胞。每5~10×10⁶个细胞至少加入0.75ml RLS。RLS和液体样品的终体积比总是3: 1。

b. 组织

用glass或强力匀浆器搅匀组织样品, 每50~100mg组织或者0.25ml组织悬液加0.75ml的RLS和4ul的carrier助沉剂。

c. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入0.3ml-0.4ml的RLS和4ul的carrier助沉剂溶解细胞, 用加样枪吹打帮助充分裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的RLS量(每10cm²加0.3-0.4ml)。不需要往裂解物里面加水, 因为培养板中附着残留的培养液已经充分稀释了RLS。

d. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在RLS试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每5~10×10⁶的动物细胞, 植物或酵母菌细胞或每1×10⁷细菌加0.75ml的RLS和4ul的carrier助沉剂。和步骤b一样用灭菌水调节样品体积到0.25毫升。在加入RLS前应避免洗涤细胞, 因为那样会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀, 在 15 -30°C 条件下孵育 10 分钟以使核蛋白体完全分解。
3. **可选步骤:** 4°C 的条件下 12, 000rpm 离心 10 分钟, 小心取上清转入一个新的 RNase free 的离心管中。
4. 每 1mlRLS 加 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖, 剧烈振荡 15 秒并将其在室温下孵育 3 分钟。

5. 于4℃12,000rpm 离心10分钟,样品会分成三层:下层有机相,中间层和上层无色的水相,RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加 RLS体积的60%,把水相转移到新管中,进行下一步操作(从离心机取出离心管的时候注意动作轻微,避免晃动导致下层有机相的DNA跑到上层水相导致DNA污染)。
6. 加入1倍体积70%乙醇(请先检查是否已加入无水乙醇!),颠倒混匀(此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入微量吸附柱中(吸附柱套在收集管内)。
7. 10,000rpm 离心45秒,弃掉废液,将吸附柱重新套回收集管。
8. 加入500 μl 去蛋白液 RE,12,000rpm 离心45秒,弃掉废液。
9. 加入700 μl 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!),12,000 rpm 离心60秒,弃掉废液。
10. 加入500 μl 漂洗液 RW,12,000 rpm 离心60秒,弃掉废液。
11. 将吸附柱放回空收集管中,12,000 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。
12. 取出吸附柱,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20-30 μl RNase free water(事先在65-70℃水浴中加热效果更好),室温放置2分钟,12,000 rpm 离心1分钟。如果需要较多 RNA,可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中,离心1分钟,或者另外再加20 μl RNase free water,离心1分钟,合并两次洗脱液。
洗脱体积越大,洗脱效率越高,如果需要 RNA 浓度较高,可以适当减少洗脱体积,但是最小体积最好不少于30 μl,体积过小降低 RNA 洗脱效率,减少 RNA 产量。

二、原理简介

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活 RNA 酶,然后总 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 water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

三、试剂盒特点

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. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好,纯度高和离心柱方便快捷的优点,不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程,RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的 RLS 裂解液配方,可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程,提取 RNA 纯度更高。

四、注意事项(实验前必须首先阅读这部分!)

1. 为防止 RNA 降解,所有离心步骤如未加说明,均在4℃低温进行。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. 裂解液 RLS 和去蛋白液 RE 中含有刺激性有害化合物,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。
3. 本试剂盒可以采用 DNase I 过柱消化 DNA,具体向 QQ768300283 或打电话 010-62979408 索取。