



UUBIO™ 细胞RNA快速抽提试剂盒

使用说明书

RNA-Quick Purification Kit

• 产品描述

本试剂盒可以从少量的生物样品中快速提取高质量的总RNA，不使用酚和氯仿等有毒物质。具有操作简单快速、稳定性高、无毒的优势。适用于细胞RNA的提取，提取得到的总RNA可用于RT-PCR、qPCR、Northern blotting、cDNA文库构建等多种实验。本试剂盒由裂解液、清洗液、洗脱液组成，其中裂解液(Lysis Buffer)中含有强变性剂和RNA酶抑制剂，能够迅速裂解样品并失活RNA酶，确保操作过程中RNA的完整性。本试剂盒大致的操作过程如下：首先用裂解液裂解样品；裂解好的样品加入乙醇混匀即可上柱，离心去掉液体将RNA结合在柱子上；杂质在清洗过程中被有效去除；洗脱RNA并用于下游实验。整个提取过程仅需10分钟。

• 产品组成

组分	U1 0018 A(100 次)	保存
Lysis Buffer	60 ml	RT
* Wash Buffer	12 ml*2	RT
Elution Buffer	10 ml	RT
10×Reaction Buffer	400 ul	-20 °C
DNA酶	200 ul	-20 °C
RNA纯化柱	100 支	RT
RNA收集管	100 支	RT

* 第一次使用前，须向Wash Buffer加48 ml 无水乙醇

• 保存条件

Elution Buffer需要分装成小份室温保存,其余试剂和RNA柱室温保存(使用中谨防试剂被污染)。附赠的DNA酶收到后需置于-20 °C保存。

• 使用建议

1. 用于细胞样品时建议用6孔板或35mm培养皿培养细胞，培养至合适的密度进行RNA提取(24孔板培养的细胞培养至90%以上的细胞密度也可使用)。不建议100mm培养皿培养的细胞直接进行RNA提取，否则可能导致细胞裂解不充分或因核酸过量导致离心柱堵塞或导致基因组残留。
2. 该试剂盒可提取 $5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞的RNA，对于T细胞/B细胞等体积很小、RNA含量很低的细胞，建议增加细胞数到至少 1×10^6 以上。



• 操作步骤

1. 样品裂解

1.1 对 $\leq 3 \times 10^6$ /孔的贴壁细胞:

- 1) 吸干培养基, 用适量的PBS洗1次;
- 2) 加入500 μ l的Lysis Buffer, 枪头吹吸或搅拌数次, 直至细胞完全裂解。转移至EP管中, vortex 10秒钟以充分裂解细胞;

1.2. 对 $> 3 \times 10^6$ /孔的贴壁细胞或悬浮细胞:

- 1) (本步适用于贴壁细胞。对于悬浮细胞, 从步骤2开始操作) 用胰酶消化将贴壁细胞悬浮起来;
- 2) 取1~3 $\times 10^6$ 个细胞的悬液至1.5 ml离心管, 500 g离心3分钟收集细胞;
- 3) 去上清, 离心管中留约10~20 μ l PBS, 轻弹离心管重悬细胞沉淀;
- 4) 加入500 μ l的Lysis Buffer, 用力吹吸10次, vortex 10秒钟, 保证细胞完全裂解;

2. 上柱/RNA提取

- 1) 向裂解的细胞中加入等体积的无水乙醇充分混匀(可能会产生沉淀,这是正常现象, 继续进行操作即可)。可将离心管剧烈颠倒几次, 或用移液器用力吹吸10次, 然后将液体转移至离心柱上。
- 2) 4,000 g离心1分钟(相当于7000 rpm左右, 如离心柱上仍有液体残留可增加转速至12,000 g离心)。

3. 柱清洗

- 1) 向RNA柱中加入500 μ l的Wash Buffer, 12,000 g离心1.5分钟(离心结束后取出柱子时注意不要让收集管内的废液接触到RNA柱, 以免污染。可以倒掉废液, 将RNA柱装回收集管, 空管离心一次, 能完全去除可能残留的Wash Buffer)。
- 2) 可选操作: 若实验对基因组的少量残留极其敏感, 可用试剂盒附赠的DNA酶处理, 具体处理方法详见最后一页:[常见问题及解决方案]第4条。如果使用的逆转录试剂盒含DNA酶, 则可省略本试剂盒的DNA酶处理。
- 3) 将柱子放到干净的无RNA酶的1.5 ml离心管上, 开盖晾干2分钟。此步骤为了彻底去除残余的乙醇。

4. RNA洗脱

- 1) 在RNA柱的膜中心部位加入30 μ l的Elution Buffer, 室温静置2分钟。
- 2) 12,000g离心1分钟(洗脱下来的RNA溶液重新加入柱中, 静置2分钟, 再次离心可提高洗脱效率, 得到更多RNA)。(RNA洗脱下来后, 建议置于冰上。)
- 3) 测定洗脱的RNA浓度, 以便于后续实验使用。提取出来的RNA可立即用于后续实验, 也可保存在-80 $^{\circ}$ C备用。



关于RNA浓度与纯度：本试剂盒提取RNA，使用Nanodrop等微量分光光度计测定OD 260/280在1.90~2.2之间均属正常（因不同仪器之间存在误差，若OD比值略有超出，但上下不超过0.1，且吸光度曲线正常，则亦可接受）。经检测，对于少量细胞或组织样品，使用本试剂盒提取的RNA浓度最低不低于30ng/ul即可使用。

实验流程图

1. 样品裂解

对于细胞样品：用Lysis Buffer裂解细胞；加入等体积的无水乙醇，充分混匀



2. 上柱/RNA结合

将上述样品裂解产物加入离心柱中



4000g室温离心1分钟



3. 柱清洗

添加500ul Wash Buffer到离心柱中



12000g室温离心1分钟



4. 洗脱

将离心柱移至新的EP管中，开盖晾干2分钟；加入30~50ul Elution Buffer到离心柱中

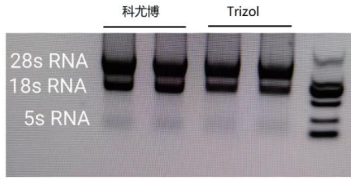


室温放置1~2分钟，12000g室温离心1分钟，弃去离心柱，洗脱产物即为RNA





• 实验结果



#	ng/μL	A260/A280	A260/A230
1	505.6	2.05	2.40
2	275.0	2.03	2.26
3	250.8	2.04	2.26
4	406.2	2.05	2.25
5	481.2	2.06	2.24

科尤博

科尤博

科尤博

• 常见解决方案

RNA产量过低，或用已经验证过的引物检测基因表达，检测到的内参基因Ct值偏大，或无法做出正常的扩增结果。

解决办法：

- a. 检查所使用的试剂是否受到污染：建议试剂盒开封后，每种buffer分装为2份每次使用时应严格按照规范操作，防止交叉污染。
- b. 溶解好的引物应该分装为小份冻存，以减少引物降解及降低污染的可能性。
- c. 检查操作流程是否正确，例如：
 1. 除DNA酶以外的所有试剂均须室温保存。若冷藏保存，应提前取出，温度恢复至室温之后方可使用。整个RNA提取的操作过程必须在室温进行，不可置于冰上(直至洗脱离心后得到RNA方可置于冰上)，以避免其间产生不溶物堵塞离心柱；
 2. Wash Buffer使用前需加入48 毫升无水乙醇混匀才可使用；
 3. 细胞裂解产物，上柱前需要加入等体积的无水乙醇，充分混匀后加入离心柱中离心；
 4. 可选步骤：若实验对基因组的少量残留极其敏感，可用试剂盒附赠DNA酶处理：RNA经wash buffer清洗一次后，按照每个样品2 μl DNase + 2 μl 10x Reaction buffer加16 μl DEPC水(或Elution Buffer)，混匀后加入离心柱中央，室温放置5分钟，然后加入 Wash Buffer清洗一次去除DNA酶，进行后续操作；
 5. 洗涤时需用12,000 g高速离心充分去除Wash Buffer，然后开盖晾干2分钟；
 6. 洗脱液的体积可以根据需要在一定范围内调整(一般20-50μl，最少不可少于10 μl，否则无法充分溶解RNA)，以浓度满足后续实验需求为宜。重复洗脱一次及延长放置时间至5分钟均可提高RNA产量。
 7. 若细胞体积较大以往采用TRIzol 试剂提取RNA时需用100 mm培养皿培养细胞，建议使用本试剂盒时仍然使用35mm培养皿培养细胞，本试剂盒最低可提取5万个左右常规细胞的RNA(T、B细胞等体积极小的细胞除外)，能满足绝大多数逆转录和qPCR的实验需要。经测试，本试剂盒最多大约可提取30μg左右的总RNA。