

天
净
沙
系
列

CAT#:71201-50
常温运输和保存

TIANDZ

柱式动物 RNA_{OUT}

Column Animal RNA_{OUT}

使用手册 V1.6

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>本产品是天泽基因动物总 RNA 快速提取试剂动物 RNA_{OUT} (CAT#: 3070) 的柱式升级产品, 可用于从各种动物组织 (包括白细胞) 快速提取总 RNA。跟动物 RNA_{OUT} 相比其主要特点是:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 操作更加简单快速, 整个过程只需要不到十分钟 (对一个样品而言)。 2. RNA 纯度更高, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 一般在 2.0 左右。 3. 一般不含用 RT-PCR 可以检测到的基因组 DNA 污染。 4. 适用于培养细胞、大部分动物组织和部分植物组织。 5. 得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern 杂交、cDNA 合成等实验 6. 性价比高于进口的柱式 RNA 提取产品。 7. 可以进行无氯仿操作, 只是纯度稍微降低, 但不影响使用。 																							
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="555 788 1294 1236"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>大纸盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>柱式动物 RNA_{OUT} 溶液 A</td> <td>71201a</td> <td>50 mL</td> </tr> <tr> <td>柱式动物 RNA_{OUT} 溶液 B</td> <td>71201b</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>离心吸附柱</td> <td>60911</td> <td>50 套</td> </tr> <tr> <td>通用洗柱液</td> <td>60408</td> <td>50 mL</td> </tr> <tr> <td>RNA 洗脱液</td> <td>71207</td> <td>10 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>71201sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成份	编号	大纸盒包装	柱式动物 RNA _{OUT} 溶液 A	71201a	50 mL	柱式动物 RNA _{OUT} 溶液 B	71201b	25 mL	离心吸附柱	60911	50 套	通用洗柱液	60408	50 mL	RNA 洗脱液	71207	10 mL	使用手册	71201sc	1 份
成份	编号	大纸盒包装																						
柱式动物 RNA _{OUT} 溶液 A	71201a	50 mL																						
柱式动物 RNA _{OUT} 溶液 B	71201b	25 mL																						
离心吸附柱	60911	50 套																						
通用洗柱液	60408	50 mL																						
RNA 洗脱液	71207	10 mL																						
使用手册	71201sc	1 份																						
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存, 溶液 A 需要放 4℃ 长期保存, 有效期一年。</p>																							
<p>自备试剂</p>	<p>氯仿。</p>																							
<p>使用方法</p>	<p>下面的操作步骤是针对在 1.5 mL 塑料离心管中进行的微量提取的, 如果处理样品量大, 请按比例增加各成份的用量并使用大的离心管和离心机。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 根据组织细胞类型的不同分为下面及种情况使用: <ol style="list-style-type: none"> a) 对贴壁细胞: 吸尽培养液, 在每 10 平方厘米细胞中加入 1 mL 柱式动物 RNA_{OUT} 溶液 A, 用枪轻柔吹打数次, 确保细胞全部裂解并且让基因组 DNA 充分断裂。 b) 对悬浮细胞: 离心收集细胞, 吸尽液体, 在每 $1-5 \times 10^6$ 悬浮细胞中加入 1 mL 柱式动物 RNA_{OUT} 溶液 A, 用枪轻柔吹打数次, 确保细胞全部裂解并且让基因组 DNA 充分断裂。如果是 fibroblasts 或 carcinoma cell, 1 mL 溶液 A 的细胞使用量不要超过 1×10^6 个细胞。 c) 对新鲜组织: 先将剪切成小块新鲜组织或液氮保存的组织放入 10 mL 或 15 mL 塑料离心管中, 每 50-100 mg 组织加 1 mL 柱式动物 RNA_{OUT} 																							

溶液 A, 用 Polytron 剪切式匀浆器匀浆 30 秒左右。对肝、脾、胰、肾等细胞分裂十分旺盛的组织 (细胞中含大量正在复制的 DNA), 建议组织的使用量不要超过 50 mg/ mL 柱式动物 RNAout 溶液 A, 否则十分容易产生 DNA 污染。也可以用液氮研磨: 在研钵中加入液氮, 再加入 50-100mg 新鲜组织, 然后研磨成粉后转移到 1.5mL 离心管中, 再加入 1mL 柱式动物 RNAout 溶液 A, 震荡 30 秒混匀。

- d) 对 RNA_{LOCKER} 保存组织: 先用纸吸去 RNA_{LOCKER} 液体后再剪切成小块, 其余操作同新鲜组织的处理。
2. 如果进行无氯仿操作 (所得 RNA 纯度稍低, 但一般不影响后续使用), 则将上步所得的细胞裂解物或匀浆液转移至一个干净的 1.5 mL 塑料离心管中, 12,000 rpm 室温离心 3-5 分钟。
3. 如果进行带氯仿操作 (所得 RNA 纯度比免氯仿操作稍高), 则将上步所得的细胞裂解物或匀浆液转移至一个干净的 1.5 mL 塑料离心管中, 然后加入 0.2 倍体积的自备氯仿 (1 mL 柱式动物 RNAout 溶液 A 需 0.2 ml 氯仿), 振荡器上充分振荡混均 30 秒, 12,000 rpm 室温离心 3-5 分钟。
4. 将上清液转移到一个干净的 2 mL 塑料离心管中。注意: 无氯仿操作时, 离心后管底是细胞碎片和结缔组织纤维。带氯仿操作时, 离心后分上下层, 下层有机相和上下层中间含有 DNA 和蛋白质, 吸取上清时避免触及, 否则将产生蛋白质和 DNA 污染。为保险起见, 可以留下 100 uL 上清液不取。同时吸取上清时最好缓慢进行。
5. 加入等体积的柱式动物 RNAout 溶液 B, 充分颠倒混匀。
6. 分次 (一般需要 2-3 次) 将加入柱式动物 RNAout 溶液 B 后的混合液转移到离心吸附柱中, 12,000 rpm 室温离心半分钟, 弃穿透液。如果溶液粘稠, 可以延长离心时间到 2 分钟。
7. 加 0.7 mL 通用洗柱液到离心吸附柱中, 12,000 rpm 室温离心半分钟, 弃收集管中的穿透液。一次洗涤一般足够去除杂质。
8. 再加 0.3 mL 通用洗柱液到离心吸附柱中, 12,000 rpm 室温离心半分钟, 弃穿透液。此步可以省略。
9. 再室温 12,000 rpm 甩半分钟。此步十分重要, 否则残留的通用洗柱液会影响 RNA 的使用。
10. 将离心吸附柱转移到一自备的 RNase-free 1.5mL 塑料离心管中, 加入 50-100 uL RNA 洗脱液。
11. 室温 12,000 rpm 离心半分钟, 离心管中溶液即为 RNA 样品, 可以立即

	<p>使用或存放于-80℃待用。</p> <p>12. RNA 的电泳检测：本试剂盒提取的 RNA 最好用甲醛变性胶电泳，如果在非变性的普通琼脂糖胶 (in TAE 或 TBE buffer) 上电泳，一定要使用 RNA 专用上样液 RNAon (操作详见 RNAon 使用手册)，千万不要使用常用的 DNA 上样液，因为 DNA 上样液没有经过去 RNase 处理，也不能将 RNA 变性，得到的带型将十分杂乱。</p> <p>13. RNA 完整性的电泳检测：如果需要做 Northern 杂交，强烈建议用户使用甲醛变性胶进行 RNA 电泳，因为非变性胶不能分离所有的 RNA 分子 (BioTechniques, 28: 414, 2000)。</p> <p>14. RNA 产量产率测定：将 5-10 μL RNA 溶于 TE 缓冲液中(pH7.5-8.2 之间)检测其在 OD260 的光吸收。通过光吸收可以得出 RNA 浓度(1 OD260 的 RNA=40 μg/mL),进而计算出 RNA 的产量(浓度 X 体积)和产率(RNA 产量/组织用量)。</p> <p>15. RNA 纯度测定：无污染的总 RNA 的 OD260/OD280 一般在 1.8-2.1 之间(具体数值与其碱基组成和溶液成分等多种因素有关)，高于此范围则分别表示样品可能有蛋白质污染，但一般不影响 RT-PCR 等反应。</p>
<p>疑难解答</p>	<p>Q: 上样孔里的红色荧光物一定是 DNA 污染吗?</p> <p>A: 不是。用 TAE 或 TBE 电泳液和非变性胶电泳 RNA 时容易产生此现象，天泽基因初步研究发现大部分红色荧光物是变性不充分的单链 RNA 通过碱基互补或通过硼酸络合 (如果使用 TBE 作电泳液的话) 形成的复合物，加 RNase 处理后，这些红色荧光物(RNA)一般会消失。为避免此现象，建议最好使用甲醛变性胶电泳和 RNA 专用上样液(如天泽基因的 RNAon)。</p> <p>Q: 如何确认和去处除污染的基因组 DNA?</p> <p>A: 如果怀疑有 DNA 污染，可以用 RNase 处理 RNA 样品，然后再电泳。如果上样孔里的红色荧光物不消失，则表示是基因组 DNA 污染。进一步确认可以使用 PCR 扩增法。去除污染的 DNA 可以使用天泽基因的非酶的 DNA 去除剂 DNA Erasol 或 RNase-free DNase，由于 RNase-free DNase 一般都有残留的 RNase 污染，所以必须严格按照厂家提供的使用手册进行操作。</p>
<p>关联产品</p>	<p>柱式 DNA 清除剂 (CAT#:90318)</p>