

RNAeasy™ Plus动物RNA抽提试剂盒(离心柱式)

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|-------|-------------------------------|-----|
| R0032 | RNAeasy™ Plus动物RNA抽提试剂盒(离心柱式) | 50次 |

产品简介:

- 碧云天的离心柱式RNAeasy™ Plus动物RNA抽提试剂盒(RNAeasy™ Plus Animal RNA Isolation Kit with Spin Column)是一种基于离心柱法从动物组织或培养的动物细胞中安全、快速、便捷、稳定、高效、高质量地抽提总RNA的试剂盒。总RNA包括大于200个核苷酸的RNA(也常被称为总RNA)和小于200个核苷酸的小RNA (small RNA)。
- 本试剂盒抽提得到的RNA可用于反转录、RT-PCR、qPCR、Northern、点杂交(Dot Blot)、纯化mRNA、体外翻译、RNase protection assay、cDNA克隆等下游实验;也可用于基因表达芯片分析(microarray)、高通量测序(high throughput sequencing)等对RNA质量要求较高的情况。
- 碧云天的三款离心柱式及Trizol法RNA抽提试剂盒的主要特点和差异如下:

| 产品编号 | R0024/ R0026/ R0027 | R0028 | R0032 | R0011/R0016 |
|----------|---|--|----------------------------|---------------------|
| 产品名称 | RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒 | RNAeasy™动物小RNA抽提试剂盒 | RNAeasy™ Plus动物RNA抽提试剂盒 | Beyozol Trizol |
| 推荐指数 | ★★★★★ | ★★★★★ | ★★★ | ★★ |
| 抽提方式 | 离心柱式 | 离心柱式 | 离心柱式 | 原始方式 |
| 抽提产物 | RNA(>200nt) | 小RNA(<200nt) | 总RNA (含<200nt的小RNA) | 总RNA (含<200nt的小RNA) |
| 操作时间 | 最短(15-20分钟) | 稍较长(20-25分钟) | 较长(25-30分钟) | 最长(45-60分钟) |
| 操作步骤 | 4步骤(少) | 6步骤(多) | 6步骤(多) | 很多步骤 |
| 使用便捷性 | ★★★★★ | ★★★★ | ★★★★ | ★★ |
| 推荐细胞量/得率 | 50-100万/5-20μg | 50万/1-2μg | 50-100万/5-20μg | 50-100万/5-20μg |
| 推荐组织量/得率 | 5-20mg/10-40μg (多) | 5mg/1-1.5μg (少) | 3-5mg/3-10μg (少) | 50mg/100-500μg (很多) |
| RNA纯度 | 高 | 高 | 高 | 高 |
| 有毒有害试剂 | 无 | 无 | 无 | 有 |
| 人体与环境安全 | 高 | 高 | 高 | 低 |
| 国外同类产品 | RNeasy Mini Kit (Qiagen) PureLink® RNA Mini Kit (Thermo) | PureLink® miRNA Isolation Kit (Thermo) | miRNeasy Mini Kit (Qiagen) | TRIzol (Thermo) |
| 用途 | 非小RNA相关各种用途 | 小RNA相关各种用途 | 不同长度RNA各种用途 | 不同长度RNA各种用途 |

- 动物组织或细胞中的RNA按照长度可以分为长链RNA(long RNA)和小RNA(small RNA),长链RNA通常大于200nt,而小RNA通常小于200nt。长链RNA按照是否编码蛋白或多肽可以分为长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)和mRNA。小RNA主要包括非编码的5.8S rRNA(ribosomal RNA)、5S rRNA、tRNA(transfer RNA)、microRNA(miRNA)、siRNA(small interfering RNA)、piRNA(Piwi-associated small RNA)、tsRNA(tRNA-derived small RNA)、srRNA(small rDNA-derived RNA)等。
- 本试剂盒抽提总RNA的基本流程如图1所示。样品在裂解液中迅速裂解,释放出总RNA与小RNA,通过两次特异性结合体系过同一纯化柱,分别结合>200nt的RNA和<200nt的小RNA,同时有效避免了杂质大量析出而阻塞纯化柱,抽提得到包括>200nt的RNA和小RNA的总RNA,基因组DNA和蛋白等杂质被有效去除,然后通过洗涤去除非特异性结合的蛋白等杂质,最后用洗脱液将总RNA洗脱下来。

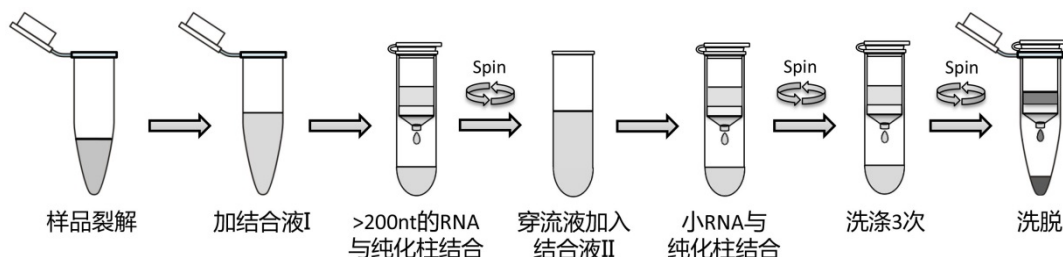


图1. 离心柱式总RNA(>200nt的RNA和<200nt的小RNA)抽提流程示意图

- **本试剂盒使用安全。**本试剂盒通过特殊的柱纯化介质进行总RNA分离纯化，能有效避免传统的Trizol法抽提时使用的酚、氯仿等有毒有害有机试剂。
- **本试剂盒使用快速、便捷。**本试剂盒采用柱纯化，无需繁琐的RNA沉淀步骤，抽提操作过程仅25-30分钟。相比于传统的Trizol抽提法，本试剂盒的操作流程显著简化，缩短了抽提时间，降低了RNA降解的风险。
- **本试剂盒抽提总RNA的得率高。**本试剂盒的抽提效果经反复测试，100万个冻存的HeLa细胞能抽提得到约15-20 μ g总RNA，5mg冻存的小鼠肝组织能抽提得到约6-10 μ g总RNA，5mg冻存的小鼠肾组织能抽提得到约3-5 μ g总RNA。不同来源的样品可能有所差异，通常新鲜样品的得率高于冻存样品。本试剂盒的抽提效果参见图2。

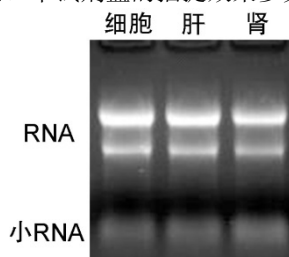


图 2. 本试剂盒总 RNA 抽提效果。样品为冻存的 50 万个 HeLa 细胞、5mg 小鼠肝组织和 5mg 小鼠肾组织。洗脱液用量均为 40 μ l。均取 6 μ l 洗脱的样品经变性处理后，在含 6.67%甲醛和适量 NA-Red 的 1.2%变性琼脂糖凝胶中电泳约 45 分钟后拍照。抽提产物的得率依次为 9.6 μ g、8.5 μ g 和 4.1 μ g，A260/A280 依次为 2.11、2.10 和 2.09，A260/A230 依次为 2.01、1.98 和 1.94。实际抽提效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，本图仅供参考。

注：纯的RNA其A260/A280约为2.0，但在很多仪器上测定时会高于2.0，低于1.9通常认为有蛋白、DNA或者酚等的污染；纯的RNA其A260/A230约为2.0左右或者略高，低于1.9通常认为有碳水化合物、胍盐、多肽或酚等的污染。

- **本试剂盒抽提得到的总RNA纯度高，**显著优于Trizol方法。抽提得到的总RNA的A260/A280通常为2.0-2.2。A260/A230通常为1.9-2.1。本试剂盒抽提获得的RNA的实测纯度参见图2。
- 本试剂盒适用于新鲜或冻存的动物组织或细胞总RNA与小RNA的抽提，推荐的细胞用量为50-100万，组织用量为3-5mg。
- 本试剂盒可用于50个样品的总RNA(含小RNA)抽提。

包装清单：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|---------|--------------|------|
| R0032-1 | 裂解液 | 16ml |
| R0032-2 | 结合液I | 16ml |
| R0032-3 | 结合液II | 38ml |
| R0032-4 | 洗涤液I | 32ml |
| R0032-5 | 洗涤液II | 63ml |
| R0032-6 | 洗脱液 | 5ml |
| R0032-7 | RNA纯化柱及废液收集管 | 50套 |
| R0032-8 | RNA洗脱管 | 50个 |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件：

室温保存，一年有效。

注意事项：

- 对于富含RNase的样品(如动物组织)，建议使用前在裂解液中添加二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)至终浓度为40mM(例如1ml裂解液中加入20 μ l 2M DTT)或 β -巯基乙醇至终浓度为1%(如1ml裂解液中加入10 μ l β -巯基乙醇)，含DTT或 β -巯基乙醇的裂解液可在室温放置1个月。
- 通过本试剂盒抽提到的RNA已经去除绝大多数DNA，通常情况无需DNase处理。后续如进行某些对极少量DNA残留较敏感的实验，则需要在使用说明中步骤5离心后，在纯化柱中加入适量DNase I(如80 μ l含10U DNase I的酶溶液，推荐使用碧云天的DNase I, D7076)，室温消化15分钟。消化结束后，不要离心，直接加入500 μ l洗涤液II，进入使用说明的步骤6进行操作。
- 本试剂盒提供的所有试剂和耗材都是RNase-free，操作时应小心，避免被污染。所有自行准备的试剂和耗材也都应是RNase-free。如果可能有RNase污染，可考虑用0.01%的DEPC水浸泡过夜，然后高温高压灭菌并烘干。操作时应避免对着样品或所使用的试剂盒耗材呼气或说话，以防RNase污染。建议戴一次性口罩操作。
- 对于操作环境中RNA酶的去除，推荐使用碧云天生产的RNase and DNase Away (R0123)以去除实验桌面上或其它接触面上的RNase。
- 使用冻存的细胞或组织抽提 RNA 的效果通常比新鲜的细胞或组织差一些。因为在细胞或组织冻融过程中一些细胞或组织内的 RNase 会被释放出来并剪切样品中的 RNA。对于组织样品，推荐使用碧云天生产的 RNALater™动物组织 RNA 稳定保存液(R0118)进行保存以保证样品 RNA 的完整性。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行，操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。

- 废液收集管在一次抽提中需多次使用，切勿中途丢弃。
- 结合液I、II和洗涤液II中含有乙醇，使用后须旋紧瓶盖以防挥发，并须按照易燃试剂的相关规范进行存放和使用。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 实验材料的准备，与样品的裂解。

细胞样品：收集50-100万左右的细胞，1000-2000g离心1分钟后弃上清，加入300 μ l裂解液，轻轻吹打8-10次至固悬物溶解、溶液澄清。

组织样品：取3-5mg动物组织，置于液氮中研磨成粉末，立即加入300 μ l裂解液。也可将组织置于1.5ml离心管中，迅速加入300 μ l裂解液，用微型电动匀浆器匀浆，或者用普通玻璃匀浆器进行匀浆。研磨或匀浆后，轻轻吹打匀浆液8-10次，室温放置3-5分钟。然后约14,000g离心2分钟，将上清液移至新的离心管中。对于比较容易裂解且匀浆很充分的组织(如肝组织、脑组织等)可以不用高速离心而直接进入步骤2。

注意：细胞的数量一般不超过200万，动物组织的用量一般不超过10mg，用量过多可能会因裂解不充分导致得率下降。如果裂解后仍有粘稠物，需增加吹打次数至溶液完全澄清。对于富含RNase的样品，裂解液中宜添加DTT至终浓度为40mM或添加 β -巯基乙醇至终浓度为1%。

2. 加入300 μ l结合液I至裂解液中，轻轻颠倒混匀3-5次。此时可能会有沉淀物产生，属于正常现象。

3. 将混合物(包括沉淀物)转移至纯化柱内，12,000g离心30秒，回收收集管内液体至一新的1.5ml离心管。

注意：对于一些特殊的样品，如出现溶液未完全通过时，可延长离心时间至1-2分钟，或者加大离心力至16,000g。对于一些能快速启动达到12,000g的离心机，离心30秒已经足够，对于一些启动速度缓慢的离心机本步骤及后续步骤中的30秒离心宜调整为60秒。

4. 向回收的液体中加入700 μ l结合液II，混匀后，将混合物(包括沉淀物)分两次通过上一步的纯化柱，每次12000g离心30秒后倒弃收集管内液体。

注意：加入结合液II后溶液总体积超过纯化柱的容量(约750 μ l)，因此须分成2次过柱，即将一半的混合物(约650 μ l)加入纯化柱内后12000g离心30秒，倒弃收集管内液体，再将剩余的混合物加入纯化柱内12000g离心30秒，并倒弃收集管内液体。

5. 加入600 μ l洗涤液I，12,000g离心30秒，倒弃收集管内液体。

6. 加入600 μ l洗涤液II，12,000g离心30秒，倒弃收集管内液体。

7. 重复步骤6一次。

8. 最高速(约14,000-16,000g)离心2分钟，去除残留的液体。

9. 将RNA纯化柱置于本试剂盒提供的RNA洗脱管中，加入30-50 μ l洗脱液，室温放置2-3分钟，最高速离心30秒，所得溶液即为纯化的总RNA。

注意：洗脱液需要加到纯化柱柱面中央，使其被完全吸收。如需获得更高浓度的样品，可把洗脱液的体积减小至20 μ l，但洗脱下来的总RNA量会相对减少。室温较低时，洗脱液在37 $^{\circ}$ C预热片刻对得率有所帮助。此外，洗脱后的溶液再次加回到原纯化柱再离心洗脱一次，可提高得率约10-30%；或者在第一次洗脱后使用新的洗脱液再洗脱一次，会获得约为第一次洗脱量15-35%的RNA。

相关产品：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|-------|--------------------------------|-------|
| R0011 | Beyozol (总RNA抽提试剂) | 100ml |
| R0016 | Trizol (总RNA抽提试剂) | 100ml |
| R0021 | DEPC水(DNase、RNase free) | 100ml |
| R0022 | DEPC水(DNase、RNase free) | 500ml |
| R0024 | RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式) | 12次 |
| R0026 | RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式) | 50次 |
| R0027 | RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式) | 200次 |
| R0028 | RNAeasy™动物小RNA抽提试剂盒(离心柱式) | 50次 |
| R0032 | RNAeasy™ Plus动物RNA抽提试剂盒(离心柱式) | 50次 |
| R0035 | BeyoMag™磁珠法动物总RNA抽提试剂盒 | 50次 |
| R0118 | RNA Later™动物组织RNA稳定保存液 | 100ml |
| R0121 | AllProtect™动物组织核酸、蛋白稳定保存液 | 25ml |
| R0122 | AllProtect™动物组织核酸、蛋白稳定保存液 | 100ml |
| R0123 | RNase and DNase Away | 250ml |
| R0125 | RNase, DNase and DNA Away | 250ml |
| R0127 | RNase, DNase, RNA and DNA Away | 250ml |
| ST036 | DEPC | 10g |