



**ELK Biotechnology**  
For research use only.

## RNA clean Kit

### RNA 纯化试剂盒

货号	规格	储藏/有效期
EP014-50T	50T	室温/一年
EP014-50T	200T	室温/一年

### 产品介绍

本试剂盒所使用的试剂不含苯酚、氯仿，极大降低了苯酚、氯仿对实验者的伤害，拓展了使用环境。本产品可从动物细胞、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，蛋白和其它杂质污染极低，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。

### 试剂盒组成

成分	EP014-50T	EP014-200T	Storage
裂解液 REL	15 ml	60 ml	RT
RNA 去蛋白液 RRPB	70 ml	140 ml*2	RT
洗涤液 RWB	60 ml	240 ml	RT
蛋白酶 K	525 $\mu$ l	2.1 ml	-20°C
DNase I 储备液	525 $\mu$ l	2.1 ml	-20°C
DNase I 缓冲液 RDB	5ml	20ml	RT
吸附柱 R 柱	50 套	200 套	RT
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	40ml	160ml	RT
说明书	1 份	1 份	RT

### 一、使用前准备

**RWB:** 使用前请将无水乙醇加入 RWB (试剂瓶上有标签提示) 中。



## ELK Biotechnology

For research use only.

### 二、操作步骤

#### 1. 样本处理:

对于贴壁细胞样本

用移液器小心吸去培养基, 加入 300 $\mu$ L RNA 提取**裂解液 REL**, 用细胞刮刀或移液枪反复吹打将细胞吹打到裂解液中, 转移混合物至 1.5mL EP 管中;

对于悬浮细胞样本

4 $^{\circ}$ C下 300 $\times$ g 离心 5min 收集细胞沉淀于 1.5mL EP 管中, 弃上清, 加入 300 $\mu$ L **裂解液 REL**, 反复吹打混匀;

对于动、植物组织样本

取 20mg 组织于 300 $\mu$ L **裂解液 REL** 中充分研磨 (可使用玻璃匀浆器或电动匀浆器, 客户自备), 混合液小心转入 1.5mL EP 管中 (过多的组织量影响裂解液效率, 可按比例增加裂解液使用量);

- 匀浆样本加入 590 $\mu$ L **RNase-Free ddH<sub>2</sub>O** 和 10 $\mu$ L **Proteinase K**, 充分震荡混匀, 56 $^{\circ}$ C水浴 10min。
- 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心 5 min, 取上清于新的 1.5mL EP 管中进行下述操作。
- 缓慢加入 0.5 倍上清体积无水乙醇 (客户自备), 颠倒混匀 (请勿剧烈震荡, 此时可能会出现沉淀), 得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 R 柱中 (吸附柱放在收集管中), 10,000 rpm (~10,000 $\times$ g)离心 1min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱 R 柱放回收集管中。(吸附柱一次可装入 750 $\mu$ l 溶液, 若一次不能将溶液和沉淀全部加入, 请分多次转入吸附柱 R 柱中)。
- 向吸附柱 R 柱中加入 750  $\mu$ l **去蛋白液 RRPB**, 10,000rpm (~10,000 $\times$ g) 离心 1min。
- 选做:** 配制 DNase I 工作液: 取 10  $\mu$ l **DNase I 储备液**于新的 RNase-Free EP 管中, 加入 90  $\mu$ l **DNase I 缓冲液 RDB**, 混匀 (DNase I 工作液最好现配现用)。
- 选做:** 向吸附柱 R 柱中加入 100  $\mu$ l **DNase I 工作液**, 室温放置 10min。  
(步骤 6 和 7, 为去除 DNA 的步骤, 根据后续实验需求, 是否有需要进行选做)
- 选做:**向吸附柱 R 柱中加入 600  $\mu$ l **去蛋白液 RRPB**, 静置 2min, 10,000rpm (~10,000 $\times$ g) 离心 1min。  
(如果样本蛋白含量较高, 可以选择加做去蛋白的步骤)
- 向吸附柱 R 柱中加入 500  $\mu$ l **漂洗液 RWB** (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 室温静置 2 min, 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心 1min, 弃废液, 将吸附柱 R 柱放回收集管中。
- 重复步骤 9。



## ELK Biotechnology

### For research use only.

11. 12,000 rpm(~13,400×g)空离 2 min, 倒掉废液。将吸附柱 R 柱置于超净台中放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意: 此步骤目的是将吸附柱 R 柱中残余的漂洗液去除, 漂洗液的残留, 可能会影响后续的 RT 等实验。

12. 将吸附柱 R 柱转入一个新的 RNase-Free 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 30-100  $\mu$ l **RNase-Free ddH<sub>2</sub>O**, 室温放置 2 min, 12,000 rpm(~13,400×g) 离心 2 min, 得到 RNA 溶液。

注意: 洗脱缓冲液体积不应少于 30  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。RNA 溶液请于-70°C 保存。

#### RNA 纯度及浓度检测

**完整性:** RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件: 胶浓度 1.2%; 1×TAE 电泳缓冲液; 120V, 20 min) 检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA, 电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。28S rRNA 的量约为 18S rRNA 的两倍, 说明 RNA 的完整性较好。

**纯度:** OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 读数在 1.8-2.1 之间, 比值为 2.0 是高质量 RNA 的标志。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品, 假定在 10 mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 读数 1.8-2.1 之间, 在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间, 但这并不表示 RNA 不纯。

**浓度:** 取一定量的 RNA 提取物, 用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 稀释 n 倍, 用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 将分光光度计调零, 取稀释液进行 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 测定, 按照以下公式进行 RNA 浓度的计算:

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times (\text{稀释倍数 } n) \times 40$$