



# GREENspin超快细胞RNA提取试剂盒

版本: 2023/05/05

免氯仿/ $\beta$ -巯基乙醇

GREENspin Cell RNA Extraction kit

Catalog # ZP433

试剂盒组成	ZP433 (50次)	ZP433 (100次)	ZP433 (200次)
裂解液CG	40 ml	80 ml	160 ml
漂洗液RW	15 ml	15 ml $\times$ 2	30 ml $\times$ 2
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	10 ml	20 ml	20 ml
RNA 吸附柱	50 T	100 T	200 T
RNA收集管 (2 ml)	50 T	100 T	200 T
说明书	1份	1份	1份

储存条件: 室温 (15°C-25°C)、避光运输和储存。保质期1年

## 产品简介

独特的裂解液迅速裂解细胞并灭活细胞RNA酶, 使总RNA在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过漂洗步骤将剩余蛋白质、细胞代谢物等杂质去除, 最后低盐的RNase Free H<sub>2</sub>O将纯净RNA从硅基质膜上洗脱。

## 产品特点:

1. 绿色无毒: 不使用有毒的苯酚、氯仿、 $\beta$ -巯基乙醇等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 操作简便: 提取步骤少, 可在15min内完成单个样品RNA的提取。
3. 提取的总RNA完整性好, OD260/OD280典型的比值高达2.1~2.2, 基本无DNA残留, 可用于RT-PCR, Northern-blot等各种下游实验。

## 操作流程:

准备: 研钵、无酶枪头、无酶1.5 mL EP管、2mL吸附柱和收集管、无水乙醇。

### 1. 细胞裂解

#### a. 贴壁细胞:

- 1) 直接裂解法: 吸除培养基, 用PBS洗涤一次细胞, 再吸除PBS后, 直接在培养板中加入裂解液CG, 每5 cm<sup>2</sup>面积加入500  $\mu$ L裂解液CG, 移液器吹打几次, 直至溶液澄清。通常对于6孔板, 直接加入750  $\mu$ L裂解液CG即可。
- 2) 胰蛋白酶处理法: 确定细胞数量, 吸除培养基, 用PBS洗涤细胞, 吸除PBS, 向细胞中加入含有0.1-0.25%胰蛋白酶的PBS处理细胞。当细胞脱离容器壁时, 加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶, 将细胞溶液转移至RNase-free的离心管中, 300g 5 min/12000rpm 10s, 收集细胞沉淀, 仔细吸除所有上清, 按500  $\mu$ L / 5 cm<sup>2</sup>面积比例, 加入裂解液CG, 立即吹打几次, 直至溶液澄清。

#### b. 悬浮细胞:

离心收集细胞, 吸除洗涤的PBS后, 加入500  $\mu$ L裂解液CG, 立即吹打几次, 直至溶液澄清。



## 细胞裂解注意事项:

- 1) 一次提取的细胞用量推荐 $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$ , 具体参见注意事项;
- 2) 避免上清残留过多影响提取, 可使用200 $\mu$ L吸头吸干净一点;
- 3) 细胞中加入裂解液CG后需要立即吹打混匀, 否则可能出现部分细胞聚集无法消化的现象, 严重影响最终RNA得率。即样品加入裂解液后, 立即吹打裂解。
2. 将裂解产物转入RNA吸附柱中 (吸附柱放入收集管中, 吸附柱最大容积为750 $\mu$ L, 裂解产物过多可多次过柱);
3. 室温静置5 min, 12000rpm 1 min, 弃掉滤液;
4. 向吸附柱内加入500 $\mu$ L漂洗液RW (在加入前需确认是否已加入无水乙醇), 12000rpm 30s, 弃掉滤液;
5. 重复步骤4;
6. 将吸附柱放回收集管中, 12000rpm 2min;
7. 取出吸附柱, 将其置于干净的RNase Free离心管中, 开盖静置2min, 在柱膜的中间部位加入30-100 $\mu$ L RNase Free ddH<sub>2</sub>O, 室温放置2min, 12000rpm 1min, 收集滤液即得细胞样品RNA。

## 注意事项:

1. 第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入无水乙醇, 加入量请参见瓶上标签。
2. 裂解液对皮肤有一定刺激性, 操作时要戴乳胶手套及口罩, 避免试剂沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 及时清水冲洗即可。
3. 使用无RNase的试剂耗材避免交叉污染。建议实验室干净整洁, 避免环境RNA酶污染。
4. 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到13,000 rpm的台式离心机即可。
5. 细胞数量控制在 $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$ 之间。由于不同细胞的RNA含量差异极大, 例如每 $1 \times 10^6$ 个Hela细胞含有15ug RNA, 而每 $1 \times 10^6$ 个COS-7细胞含有35ug RNA, 因此在不清楚细胞的RNA含量时可以先梯度实验摸索适合的细胞量。
6. 裂解液和细胞混匀裂解后, 不能及时操作, 可-20 $^{\circ}$ C放置保存, 以后再进行下面的步骤 (裂解产物在-20 $^{\circ}$ C下放置16h, RNA得率会减少20%左右, 但无明显降解); 裂解产物不可长期室温放置 (实验表明, 在37 $^{\circ}$ C下放置1h, RNA发生明显的降解), 样品多时, 可分批或15分钟内往下操作。
7. 关于DNA的微量残留: 本试剂盒独特的裂解液可以清除绝大多数的DNA残留, 不需要DNase额外消化, 可直接用于RT-PCR和qRT-PCR。个别特殊情况如DNA含量过于丰富造成残留或者要进行严格的下游实验, 则可在第3步后进行DNase I柱上消化 (ZP430):
  - a. 向柱内悬滴80 $\mu$ L DNase I工作液, 室温消化5min (不要离心); (DNase I工作液配方: 78 $\mu$ L DNase Buffer + 2  $\mu$ L DNase I, 临用临配)
  - b. 继续加入500 $\mu$ L去蛋白液CR, 13,000 rpm离心30 s, 弃废液。