

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Bone Tissue RNA Kit

骨组织RNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC1301

01/产品组分

序号	组分	50次 AC1301
1	裂解液 CLB	50 mL
2	PLANTspark	5 mL
3	裂解液 RLT Plus	25 mL
4	去蛋白液 RW1	40 mL
5	漂洗液 RW	10 mL 第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇
6	RNase Free H ₂ O	10 mL
7	基因组 DNA 清除柱 和收集管	50 套
8	RNase Free 吸附柱 RA 和收集管	50 套
9	RNase-Free 收集管 (1.5 mL)	50 个

02/保存条件

本试剂盒所有组分室温 (15-25°C) 保存。

03/产品概述

骨组织坚硬、骨细胞密度低、而且外周基质含有大量黏蛋白 (蛋白多糖) 和 RNA 难以分离, 无法用传统 SparkZol 法进行高质量提取。本试剂盒采用独有的不含苯酚/氯仿配方的裂解液, 并添加多种成分去除骨组织蛋白多糖。同时基因组 DNA 清除柱可以有效清除 gDNA 残留, 得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化, 可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 离心沉淀去除多糖和次级代谢产物, 裂解混合物用乙醇调节 RNA 结合吸附到基因组 DNA 清除柱, 然后 RNA 被选择性洗脱滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后, RNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的

去蛋白、漂洗的步骤将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase Free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。该产品可在 50 min 内完成样品 RNA 的提取，提取的总 RNA 完整性好，无蛋白和基因组 DNA 污染。

04/自备材料

无水乙醇

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 样品处理量绝对不要超过基因组 DNA 清除柱和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时可使用较少的样品处理量，再根据样品试验情况增加或者减少处理量。
- ◇ 裂解液 CLB 和 RLT Plus 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- ◇ 取 1 mL 裂解液 CLB 至离心管内（如果 CLB 有析出或者沉淀需先置于 65°C 水浴重新溶解），在裂解液 CLB 中加入 100 μL PLANTspark，颠倒混匀后 65°C 水浴中预热。多个样品按照比例放大准备。
- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25 °C）下进行。

06/使用方案

1. 样本处理：

● 液氮研磨法：

- a. 骨钳夹碎骨组织后放入研钵（研钵在 180 °C 干烤 2 h），加入液氮后反复研磨成细粉，注意液氮蒸发后不断补加，保持液氮一直存在。
- b. 转移 30-150 mg 细粉加至预热的裂解液 CLB（已加有 PLANTspark）离心管中。立即剧烈涡旋 30-60 s 或者用吸头吹打混匀裂解直到得到满意匀浆结果（或者电动匀浆 30 s），可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- c. 立刻接操作步骤 2。

● 其它骨组织破碎方法：

- a. 取 30-150 mg 骨组织加入 1 mL 预热的裂解液 CLB（已加有 PLANTspark）高速均质仪粉碎匀浆。或者取 30-150 mg 液氮冷冻包埋切片粉碎的骨头加入裂解液 CLB（已加有 PLANTspark）粉碎匀浆。
- b. 立刻接操作步骤 2。

2. 短时放回 65 °C 水浴中（10 min），中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。

3. 将裂解物 4 °C 12,500 rpm (14,500×g) 离心 10 min, 沉淀不能裂解的碎片。
4. 取裂解物上清 (在不超基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇 (0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。
▲若上清表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面液体即可。
5. 将混合物 (每次小于 720 μL, 可以分两次加入) 加入一个基因组清除柱中 (清除柱放入收集管中), 12,500 rpm (14,500×g) 离心 2 min, 弃废液。
▲确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。
6. 将基因组 DNA 清除柱放在一个干净 2 mL 离心管内 (不用 RNase Free 或者 DEPC 处理, 一般干净的新离心管即可, 也可使用 RNA 吸附柱配套的新的干净收集管), 在基因组清除柱内加 500 μL 裂解液 RLT Plus, 12,500 rpm (14,500×g) 离心 30 s, 收集滤液 (RNA 在滤液中), 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (通常为 450-500 μL 左右, 滤过时候损失体积应该减去), 加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。
7. 立刻将混合物 (每次小于 720 μL, 可以分两次加入) 加入一个吸附柱 RA 中 (吸附柱放入收集管中), 12,500 rpm (14,500×g) 离心 2 min, 弃废液。
▲确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。
8. 加 700 μL 去蛋白液 RW1, 室温放置 1 min, 12,500 rpm (14,500×g) 离心 30 s, 弃废液。
9. 加入 500 μL 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,500 rpm (14,500×g) 离心 30 s, 弃废液。加入 500 μL 漂洗液 RW, 重复一遍。
10. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,500 rpm (14,500×g) 离心 2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 取出吸附柱 RA, 放入一个 RNase Free 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μL RNase Free H₂O (事先在 70-90 °C 水浴中加热可提高产量), 室温放置 1 min, 12,000 rpm (13,400×g) 离心 1 min。
12. 如果预期 RNA 产量 > 30 μg, 加 30-50 μL RNase Free H₂O 重复步骤 11, 合并两次洗脱液, 或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复洗脱一遍 (如果需要 RNA 浓度高)。
▲使用第一次洗脱液重复洗脱两遍的 RNA 浓度高, 分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%, 但是浓度要低, 用户根据需要选择。

07/流程简图



裂解: 30-150mg骨组织细粉, 预热**裂解液CLB** (已加有**PLANTspark**)
65°C 水浴10 min, 4°C, 14,500×g离心10 min



去DNA: 吸上清, 0.5倍上清体积的无水乙醇
转移混合物至**基因组DNA清除柱**
14,500×g离心2 min, 弃滤液



结合: 换干净2 mL离心收集管
500μL**裂解液RLT Plus**, 14,500×g离心30 s
收滤液0.5倍滤液体积的无水乙醇, 转移至**吸附柱RA**
14,500×g离心2 min, 弃废液



去蛋白: 700 μL**去蛋白液RW1**, 室温1 min, 14,500×g离心30 s, 弃滤液
漂洗: 500 μL**漂洗液RW**, 14,500×g离心30 s, 弃滤液, 重复一次
去残留乙醇: 14,500×g空甩2 min



洗脱: 30-50 μL **RNase Free H₂O**, 室温1 min, 13,400×g离心1 min
可重复洗脱一次, 储存于-70°C

08/相关产品

AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit (With gDNA Eraser)

AG0305 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR (With gDNA Eraser)

AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix (With ROX)

本产品仅用于科学研究!

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

