

Version: AC5.0 (2024.02.22修订)

# SPARKeasy Mollusc RNA Kit

## 软体动物RNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC0204

### 01/产品组分

序号	组分	50 次 AC0204
1	RNA 吸附柱	50 个
2	2 mL 收集管	100 个
3	RNA 提取试剂	60 mL
4	缓冲液 RB	30 mL
5	漂洗液I	45 mL
6	漂洗液II	12 mL 第一次使用前加入 48 mL 无水乙醇
7	DEPC H <sub>2</sub> O	20 mL
8	RNase-Free 收集管 (1.5 mL)	50 个

### 02/保存条件

RNA提取试剂4°C保存，其他组分室温（15-25°C）保存。

### 03/产品概述

本试剂盒适用于从软体动物、节肢动物、蛔虫、扁虫和其他富含粘多糖的无脊椎动物组织样本中有效回收大于 200 nt 的总 RNA。将样品均质化并在 RNA 提取试剂中裂解，并用氯仿提取以除去粘多糖和变性蛋白质。在快速醇沉淀步骤后，调节结合条件并使用 RNA 吸附柱进一步纯化 RNA。基于该方法，除去盐、蛋白质和其他污染物以产生适合下游反应的高质量总 RNA，比如逆转录，poly (A) + mRNA 选择和杂交等分子生物学实验。该产品可在一小时之内完成样品 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、β-巯基乙醇、氯仿、异丙醇

## 05/注意事项

### 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 实验操作过程要戴上手套以尽量减少 RNase 污染。使用提供的试剂时，请使用干净的无 RNase 一次性塑料移液器吸头。
- ◇ 在开始实验前，将样品和试剂平衡至室温。除非另有说明，否则所有步骤均应在室温下进行。
- ◇ 在开始实验之前准备所需的所有材料以尽量避免 RNA 降解。使用新鲜组织以确保 RNA 完整性。
- ◇ 小心地将样品或溶液加到 RNA 吸附柱的中间位置，避免用移液器吸头接触基质膜。
- ◇ β-巯基乙醇是变性 RNase 的关键，可在使用前加一定量的β-巯基乙醇到缓冲液 RB 中。每 1 mL 缓冲液 RB 加入 20 μL β-巯基乙醇。

## 06/使用方案

### 1. 样品处理：

#### ◆节肢动物

- a. 用研钵和研杵在液氮中粉碎不超过50 mg的组织。
  - ▲如果没有陶瓷研钵和研杵，使用一次性微管杵将离心管中的样品均质化。
- b. 将粉末转移到干净的1.5 mL离心管中。
- c. 接下操作步骤2。

#### ◆软体动物（和其他软体无脊椎动物）

- a. 用研钵和研杵在液氮中粉碎不超过50 mg的组织。
- b. 将粉末转移到干净的1.5 mL离心管中。
  - ▲如果没有陶瓷研钵和研杵，则使用一次性微管杵将离心管中的样品均质化。
- c. 接下操作步骤2。
  - ▲起始材料的量取决于样品，如果使用建议的30 mg组织获得可接受的结果，则可以增加；对于易于加工的样品，可以按比例放大样本量并且使用的缓冲液体积按比例增加；总之，每个RNA吸附柱使用不超过50 mg的组织，因为可能会超过结合容量（100 μg）。同时，难处理的组织需要从小于30 mg的组织开始实验并且使所有缓冲液体积加倍以确保充分的溶解。

2. 加入1 mL RNA提取试剂，涡旋混合彻底，确保所有团块都散开，否则RNA不能从组织中有效提取。

3. 加入200 μL氯仿（每1 mL RNA提取试剂），涡旋15 s，混合彻底，室温放置3 min。

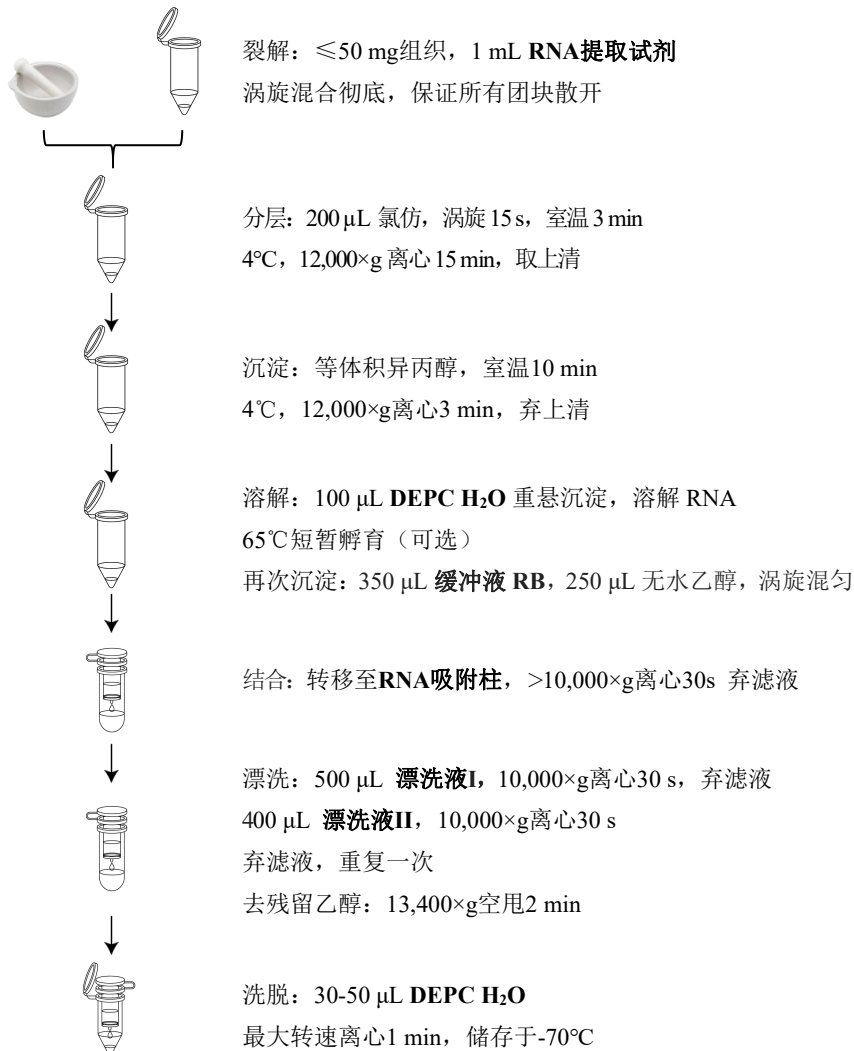
4. 4°C、12,000×g离心15 min。将上层水相转移至干净的1.5 mL离心管中，尽量避开含有污染物和抑制剂的乳状界面。
  - ▲该步骤将从溶液中除去大部分多糖和蛋白质，并改善下游的吸附柱性能。
5. 加入等体积的异丙醇，涡旋混合彻底，室温孵育10 min，4°C、12,000×g离心3 min。
6. 在不干扰RNA的情况下，尽可能多地吸出并丢弃尽可能多的上清液，将离心管倒置在纸巾上1 min，以使残留的液体排出，注意不要过度干燥。
7. 加入100 μL的DEPC处理的水重悬RNA沉淀，为了有效溶解RNA，可以在65°C进行短暂孵育。

**注意：以下操作步骤均在室温下进行。**

8. 加入350 μL缓冲液RB，然后加入250 μL无水乙醇，涡旋混匀。
  - ▲缓冲液RB必须在使用前与β-巯基乙醇混合，混合物可室温保存1周。
9. 将全部样品（包括可能形成的沉淀物）转移到RNA吸附柱中，以大于10,000×g离心30 s，丢弃滤液并将吸附柱重新放回收集管。
  - ▲可选步骤。由于RNA吸附柱的基质膜清除了大部分DNA，因此大多数下游反应不需要DNase I消化。然而，某些敏感的RNA反应可能需要进一步去除DNA。如果需要额外的DNA去除步骤，请按相应步骤操作；如果不需要DNase I消化，请继续执行步骤10。
10. 将500 μL漂洗液I加入RNA吸附柱中，以10,000×g离心30 s，丢弃滤液和收集管。
11. 将RNA吸附柱转移到新的2 mL收集管中，在RNA吸附柱中加入400 μL漂洗液II，以10,000×g离心30 s，丢弃滤液并将吸附柱重新放回收集管。
12. 重复步骤11，用漂洗液II重复洗涤。以最大速度离心2 min，以完全干燥RNA吸附柱。
13. 将RNA吸附柱转移至干净的1.5 mL离心管，加入30-50 μL DEPC水。以最大速度离心1 min并将洗脱的RNA保存在-70°C。
  - ▲以下步骤的任何组合可用于帮助增加RNA产量。
    - 在加入吸附柱之前，将DEPC水加热至70°C。
    - 将孵育时间延长至5 min。
    - 增加洗脱体积。
    - 用新鲜的DEPC水重复洗脱步骤（这可能会提高产量，但会降低浓度）。
    - 使用第一次洗脱的洗脱液重复洗脱步骤（这可以在保持洗脱体积的同时提高产率）。

**附录：DNA 酶柱上消化（详细请参考 AC1710 DNase I 柱上消化试剂盒说明书）。**

## 07/流程简图



## 08/相关产品

AC0101 SparkZol Reagent

AC1710 DNase I 柱上消化试剂盒 (RNase Free)

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](mailto:support@sparkjade.com)

