

一般实验室使用，仅用于**体外**

血液（液体样本）总RNA快速提取试剂盒（离心柱型）

用于快速提取血液及其他液体形式样本高纯度总RNA

目录号：**RP4001（50次）** **RP4002（100次）**

使用手册

2016年3月，第4版

目 录

一、试剂盒组成、储存、稳定性·····	1
二、原理简介·····	2
三、试剂盒特点·····	2
四、注意事项·····	2
五、操作步骤·····	4
六、疑难解答·····	6



北京百泰克生物技术有限公司
Biotek Corporation

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50次 (RP4001)	100次 (RP4002)
裂解液 RLS	4℃避光	55 ml	55 ml×2
去蛋白液 RE	室温	30ml	60ml
漂洗液 RW	4℃ (一个月)	15 ml	25 ml
	-20℃ (长期)	第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10ml	20ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O	18mlRNase-free H ₂ O
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-Free Dnase (仅 II 型提供)	-20℃	100ul	200ul
10×Reaction Buffer (仅 II 型提供)	-20℃	150ul	300ul
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个

注意事项

- 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
- 不合适的储存于低温（4℃或者-20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃-25℃）进行。裂解液 RLS 可以常温运输，收到后 4℃避光保存。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

二、原理简介

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后总 RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

三、试剂盒特点

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
- 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
- 独有的裂解液 RLS 配方，可以有效的消除基因组污染。
- 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
- 有效的去除了无用的 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。

四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分！）

- 为防止RNA降解，所有离心步骤如未加说明，均在4℃低温进行。使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
- 裂解液 RLS 和去蛋白液 RE 中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，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。
- 本试剂盒可以采用 DNase I 过柱消化 DNA。
- 预防 RNase 污染，在实际的操作中应遵循以下指南（参见《分子克

隆》)

- * 全程佩戴一次性手套。皮肤经常带有细菌和霉菌，可能污染RNA的抽提并成为RNA酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。
 - * 使用灭菌的、一次性的塑料器皿和自动吸管抽提RNA，避免使用公共仪器所导致的RNA酶交叉污染。
 - * 使用无RNA酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在150℃的烘箱中烘烤4小时，塑料器皿可以在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。
5. 考虑到环保问题，本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，用户使用前需要自备氯仿。
 6. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析RNA的质量。好的RNA产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体RNA带，分别为~5Kb(28S)，~2Kb(18S)，条带亮度比值约为2:1。有时候也可以看到~0.1kb和0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到4, 5条带也属于正常现象，如果RNA未成熟的前体或者不均一核RNA、小核RNA提取出来也可能看到介于7Kb和15Kb之间的不连续的高分子量条带。
 7. 检测OD₂₆₀/OD₂₈₀吸光度比值时，RNA样品应该溶于TE后检测，如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和PH值低，会使OD₂₈₀升高，从而使比值降低。
 8. 加入裂解液RLS匀浆后，加氯仿前，样品可在-60℃-70℃保存一个月以上。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在漂洗液RW瓶和70%乙醇瓶中加入指定量乙醇!

1. 匀浆处理

a. 生物液体 每0.25ml液体样品(血清, 血浆, 脑脊液等等)加入0.75ml裂解液RLS, 用加样枪吹打液体样品几次以帮助裂解样品中细胞。每5~10×10⁶个细胞至少加入0.75ml裂解液RLS。裂解液RLS和液体样品的终体积比总是3:1。

b. 组织 用glass或强力匀浆器搅匀组织样品, 每50~100mg组织或者0.25ml组织悬液加0.75ml的裂解液RLS。一般50~100mg组织体积都要小于0.25ml, 如果组织样品的体积小于0.25ml, 加入灭菌水将组织样品体积调整到0.25ml以保证体积比例是3:1。

c. 单层生长的细胞 直接往直径3.5 cm的培养板中加入0.3ml-0.4ml的裂解液RLS溶解细胞, 用加样枪吹打帮助充分裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的裂解液RLS量(每10cm²加0.3-0.4ml)。不需要往裂解物里面加水, 因为培养板中附着残留的培养液已经充分稀释了裂解液RLS。

d. 悬浮生长的细胞 通过离心来沉淀细胞。在裂解液RLS试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每5~10×10⁶的动物细胞, 植物或酵母菌细胞或每1×10⁷细菌加0.75ml的裂解液RLS。和步骤b一样用灭菌水调节样品体积到0.25毫升。在加入裂解液RLS前应避免洗涤细胞, 因为那样会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

2. 将匀浆样品剧烈涡旋混匀至少1分钟, 在15-30℃条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。

注意: 如需要短期保存, 可在完成第二步后, 转入低温保存或低温运输。

3. **可选步骤: 如果溶液中有明显团块不溶物,** 可以在4℃的条件下12, 000rpm离心10分钟, 小心取上清转入一个新的RNase free的离心管中。

4. 每1ml裂解液RLS加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖, 剧烈振荡15秒并将在室温下孵育3分钟。

5. 于4℃12, 000rpm离心10分钟, 样品会分成三层: 下层有机相, 中间层和上层无色的水相, RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加裂解液RLS体积的60%, 把水相转移到新管中, 进行下一步操作。

6. 加入 1 倍体积 70%乙醇 (请先检查是否已加入无水乙醇!), 颠倒混匀 (此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中 (吸附柱套在收集管内)。

7. 10,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液, 将吸附柱重新套回收集管。

8. 加入 500 μ l 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制酶消化反应。

9. (可选步骤) 加入已配置好的消化液 30 μ l 于吸附膜的中间部位, 37 $^{\circ}$ C 保温 15-30 分钟。消化液的配置比例: RNase-Free DNase 2 μ l, DNase 10 \times Reaction Buffer 3 μ l, RNase-Free Water 25 μ l; RNase-Free DNase 的用量可根据 DNA 量多少来调节, 1 μ lRNase-Free DNase 可以消化 1 μ g 的 RNA, 10 \times Reaction Buffer 的量按照比例增减。

10.加入 500 μ l 去蛋白液 RE, 室温放置 2 分钟, 12,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液。

11.加入 500 μ l 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。

12.重复步骤 11。

13.将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

14.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 50-80 μ l RNase-free water(事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。如果需要较多 RNA, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心 1 分钟, 或者另外再加 30 μ l RNase-free water, 离心 1 分钟, 合并两次洗脱液。

洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 RNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积最好不少于 30 μ l, 体积过小降低 RNA 洗脱效率, 减少 RNA 产量。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
RNA产量低	样品裂解或者匀浆不彻底	液氮研磨的时候尽量研磨完全, 加入裂解液 RLS 后剧烈震荡或者用枪头吹打帮助裂解。匀浆步骤可以提高产量。新鲜组织或者植物组织可以不需液氮, 在干净研钵内加入适量裂解液 RLS 直接研磨。
	使用的样品或者裂解物在 -20 $^{\circ}$ C 或者 -70 $^{\circ}$ C 存放太久	存放时间过长可能降低 RNA 产量, 应尽快处理样品或者裂解物。
	组织本身含 RNA 少	不同类型的组织和细胞含有不同量的 RNA, 对于含量少的组织应该适当提高起始处理量。
	超过了吸附柱的最大吸附能力	同一个样品使用多个吸附柱, 然后合并得到 RNA。
	去蛋白液 RE 和漂洗液 RW 内忘记加乙醇	第一次实验时, 漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇。
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ 吸光度比值<1.6	分光光度计检测吸光度时, RNA 样品不是溶于 TE, 而是溶于水。低离子浓度和低 pH 条件下, OD ₂₈₀ 值会较高, 造成比值低。	检测时用 TE 稀释样品

接前表

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
	污染了蛋白或者苯酚	做步骤 5 吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相和下层有机相，确保做了步骤 8。
基因组DNA污染	起始样品量超出了裂解液 RLS 的处理范围	选择合适的起始处理量。
	样品中含有有机溶剂（如乙醇，DMSO 等），强缓冲液或碱性溶液。	避免这些可以改变裂解液 RLS 性质或者 PH 值的物质。
	吸取上清时吸入了中间相	做步骤 5 吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相。
RNA降解，完整性不佳	RNA 提取所用各种物品和试剂没有灭活 RNA 酶	按照注意事项准备 RNA 提取的各种用品。
	组织取出后没有马上处理或冷冻，提取前已经降解	组织应该尽量立刻处理，不能及时处理的应该尽快保存于液氮或者 -70℃。
	提取的 RNA 样品没有保存在 -20℃ 或 -70℃ 低温	尽可能的将 RNA 保存在 -70℃ 的低温。
	样品提取过程中降解	提取动作应该尽可能的快，离心应该低温进行，取用 RNA 时尽量冰上进行。
下游的RT-PCR实验不成功	忘记做步骤 11，或者将吸附柱取出时下端碰到了收集管里面的漂洗液，造成洗脱下来的 RNA 含有乙醇，乙醇抑制了逆转录反应	确保做了步骤 11，然后小心取出吸附柱，可以在空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。



BioTeke

北京百泰克生物技术有限公司
BioTeke Corporation

地 址：北京海淀区留学人员创业园

电 话：010-62951781

传 真：010-62951781

网 址：www.bioteke.com

Email: info@bioteke.com