

一般实验室使用，仅用于 *体外*

微量样品总RNA提取试剂盒 (离心柱型)

用于快速提取各种微量动植物细胞/组织高纯度总RNA

目录号: **RP5101** (50次)

使用手册

2014年1月, 第1版



北京百泰克生物技术有限公司
Bioteke Corporation

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

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50 次 (RP5101)
裂解液 RL	4℃避光	55 ml
Carrier	4℃	600μl
去蛋白液 RE	室温	30ml
漂洗液 RW	4℃一个月 (-20℃长期)	15ml
		<i>第一次使用前按说明 加指定量乙醇</i>
RNase-free H ₂ O	室温	10ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O
		<i>第一次使用前按说明 加指定量乙醇</i>
微量 RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

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 RL 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 RL 裂解液配方，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。
- 加入了 Carrier 有助于微量 RNA 的聚集吸附。

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 RL 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。

3. 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 °C 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 加入裂解液 RL 匀浆后, 加氯仿前, 样品可在 -60°C-70°C 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. 组织

用玻璃或强力匀浆器搅匀组织样品, 保存于液氮内样品需要用研钵磨碎, 每50~100mg 组织加1ml的裂解液RL后匀浆。组织样品容积不能超过RL容积的10%。对于胚胎及各类脏器尤其应该注意样品的新鲜, 新鲜的样品一经取下就应该马上放入液氮或直接浸入裂解液中, 并立即匀浆做下步操作(匀浆时间短, 速度快能有效避免RNA的降解), 如果不能马上做实验, 应该立刻放入-70°C。

b. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入1ml的RL溶解细胞, 并用移液枪轻轻吹打混匀。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的RL量(每10cm²加1ml)。一般情况下, 普通大小的细胞培养瓶, 加入1ml的RL, 迅速轻摇使RL充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活RNA酶, 轻轻用移液枪反复吹打混匀。当RL量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

c. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在RL试剂中用移液枪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1ml的RL。在加入RL前应避免洗涤细胞, 否则会增加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. 将匀浆样品剧烈震荡混匀, 在 15 -30 °C 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。
3. 可选步骤: 4 °C 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 1mlRL 加 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖, 剧烈振荡 15 秒并将其在室

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RL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!**），加入 6ul 的 Carrier,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 500μl 去蛋白液 RE，12, 000rpm 离心 45 秒，弃掉废液。
9. 加入 700μl 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。
10. 加入 500μl 漂洗液 RW，12,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
11. 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。
12. 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 15-60μl RNase free water（事先在 65-70℃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 15μl 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 15μl，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 RL 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 RL 直接快速研磨。
	使用的样品或者裂解物在-20℃或者-70℃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 RL 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 RL 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。



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