



## 核酸提取试剂使用说明书

### 【产品名称】

产品通用名称: 高纯总 RNA 快速提取试剂盒 (离心柱型)

产品商用名称: **高纯总 RNA 快速提取试剂盒 (离心柱型)**

### 【包装规格】

RP1201 (20 次)      RP1202( 50 次 )

### 【检验原理】

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。

### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	20 次 (RP1201)	50 次 (RP1202)
裂解液 RL	4℃ 避光	25 ml	55 ml
去蛋白液 RE	室温	15ml	30ml
漂洗液 RW	4℃ (一个月) -20℃ (长期)	6 ml	15 ml
		<i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>	
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	5 ml	10ml
70%乙醇	室温	4ml RNase-free H <sub>2</sub> O	9ml RNase-free H <sub>2</sub> O
		<i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>	
Dnase (仅 II 型提供)	-20	40ul	100ul
10× Buffer (仅 II 型提供)	-20	60ul	150ul
RNase-free 吸附柱 RA	室温	20 个	50 个
收集管 (2ml)	室温	20 个	50 个

## 【储存条件及有效期】

- 1、本试剂盒有效期一年，请在有效期内使用。
- 2、为了避免试剂长时间暴露于空气中发生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

## 注意

1. 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！
2. 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。
3. 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。
4. 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。

## 试剂盒特点

1. 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。
2. 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。
3. 独有的 RL 裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
5. 有效的去除了无用的 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。

## 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%。

#### 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10cm<sup>2</sup>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5~10×10<sup>6</sup>的动物细胞，植物或酵母菌细胞或每1×10<sup>7</sup>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。

当样品富含蛋白质、脂肪、多糖或是细胞外物质例如肌肉。脂肪组织或植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在 2-8°C 的条件下以 12,000rpm 离心 10 分钟，移除匀浆中不溶解的物质，余下的沉淀中包含有细胞外膜、多糖、以及高分子量 DNA，而上层的超浮游物含有 RNA。
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°C 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!**），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 500μl 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。
9. 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。
10. **（可选步骤）**加入已配置好的消化液 30μl 于吸附膜的中间部位，37°C 保温 15-30 分钟。消化液的配置比例：RNase-Free DNase 2ul，DNase 10×Reaction Buffer 3ul，RNase-Free Water 25ul；RNase-Free DNase 的用量可根据 DNA 量多少来调节，1μlRNase-Free DNase 可以消化 1μg 的 RNA，10×Reaction Buffer 的量按照比例增减。
11. 加入 500μl 去蛋白液 RE，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 45 秒，弃掉废液。
12. 加入 500μl 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。
13. 重复步骤 12。
14. 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。
15. 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 50-80μl RNase-free water（事先在 65-70°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 30μl RNase-free water，离心 1 分钟，合并两次洗脱液。

## 注意事项（实验前必须首先阅读这部分！）

- 1, 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。
- 2, 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℃ 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 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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 OD<sub>280</sub> 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℃-70℃ 保存一个月以上。

## 【生产企业】

企业名称: 无锡百泰克生物技术有限公司

注册地址: 无锡惠山经济开发区惠山大道 1719-5 号四层 A 区

生产地址: 无锡惠山经济开发区惠山大道 1719-5 号四层 A 区

邮政编码: 214100

电话/传真: 400-678-8982

网址: [www.bioteke.cn](http://www.bioteke.cn)

## 【说明书核准及修改日期】

说明书修改日期 2025 年 03 月 22 日