



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】

RP4001 (50 次) RP4002(100 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	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） -20℃（长期）	15 ml	25 ml
		<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	20ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O	18mlRNase-free H ₂ O
		<i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>	
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

【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 RLS 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. 独有的裂解液 RLS 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. **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°C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°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1ml裂解液RLS加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡15秒并将裂解液在室温下孵育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500μl漂洗液RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000rpm离心60秒，弃掉废液。将吸附柱RA放回空收集管中，12,000rpm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。

10.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。

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

12.将吸附柱RA放回空收集管中，12,000rpm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。

13.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，12,000rpm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。

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30μl，体积过小降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。

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，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 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。**
3. **本试剂盒可以采用 DNase I 过柱消化 DNA。**
4. 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。

【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

【说明书核准及修改日期】

说明书修改日期 2025 年 03 月 22 日