

一般实验室使用，仅用于**体外**

# 无氯仿RNA提取试剂盒 (离心柱型)

用于快速提取各种动植物细胞/组织中的总RNA

目录号: RP55010 (20次)    RP55011 (50次)  
                  RP55012 (100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	20次 (RP55010)	50次 (RP55011)	100次 (RP55012)
裂解液 DLS	室温	25ml	55 ml	110 ml
去蛋白液 RE	室温	25ml	60ml	120ml
漂洗液 RW	4°C (一个月)	9ml	25 ml	50 ml
	-20°C (长期)	<b>第一次使用前按说明加指定量乙醇</b>		
70%乙醇	室温	18ml	45ml	90ml
		<b>第一次使用前按说明加指定量乙醇</b>		
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	10ml	20ml	40ml
RNase-Free Dnase	-20°C	40ul	100ul	200ul
10×Reaction Buffer	-20°C	60ul	150ul	300ul
RNase-free 吸附柱 RA	室温	20 个	50 个	100 个
RNase-free 吸附柱 RB	室温	20 个	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	40 个	100 个	200 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°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
- 不合适的储存于低温（4°C 或者 -20°C）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°C - 25°C）进行。
- 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。
- 裂解液 DLS 使用前加入 β-巯基乙醇至终浓度 4%。

## 二、原理简介

独特的裂解液裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后基因组和 RNA 在高离子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。
- 稳定性好、纯度高、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。
- 多次漂洗去蛋白过程，提取基因组和 RNA 纯度更高。

## 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°C 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 DLS 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. 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。
5. 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。
6. 加入裂解液 DLS 匀浆后, 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 (裂解液 DLS 使用前加入 β-巯基乙醇至终浓度 4%)

### a. 组织

液氮研磨样本, 每20-50mg组织加1ml的裂解液DLS后涡旋震荡1分钟, 组织样品容积不能超过DLS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DLS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DLS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DLS, 迅速轻摇使DLS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。

### c. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在DLS试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。每1×10<sup>7</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DLS。在加入DLS前应避免洗涤细胞, 否则会增加mRNA降解的可能性。破裂某些真菌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 37 °C 条件下孵育 5 分钟 (或 56 °C 1-3 分钟/室温 10 分钟亦可) 以使核蛋白体完全分解。
3. 4 °C 的条件下 12, 000rpm 离心 2-5 分钟, 小心取上清转入一个新的 RNase free 的吸附柱 RB 中。
4. 于 4°C 12, 000rpm 离心 2 分钟, 收集下滤液 (含有总 RNA) 于集管中, 进行下一步操作。
5. 在收集管中加入 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), 溶液太多可以分次过柱。
6. 10, 000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液, 将吸附柱重新套回收集管。

7. 加入 500 $\mu$ 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。
8. 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. 加入已配置好的消化液 30 $\mu$ 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 $\mu$ l, DNase 10 $\times$ Reaction Buffer 3 $\mu$ l, RNase-Free Water 25 $\mu$ l; RNase-Free DNase 的用量可根据 DNA 量多少来调节, 1 $\mu$ lRNase-Free DNase 可以消化 1 $\mu$ g 的 RNA, 10 $\times$ Reaction Buffer 的量按照比例增减。
10. 加 500  $\mu$  l 去蛋白液 RE, 12, 000rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。
11. 加入 500  $\mu$  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, 根据预期基因组和 RNA 产量在**吸附膜的中间部位**加 50-80  $\mu$  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。如果需要彻底消除 DNA, 可以在步骤 8-9 之间采用过柱消化 DNA 步骤。

## 六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
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 DLS 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, 直接在干净研钵内加入适量裂解液 DLS 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	<b>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。</b>
OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub> 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 <sub>280</sub> 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	
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](http://www.bioteke.com)

Email: [info@bioteke.com](mailto:info@bioteke.com)