

一般实验室使用，仅用于 *体外*

凝固血总RNA快速提取试剂盒(离心柱型)

用于快速提取凝固血样本高纯度总RNA

目录号: **RP5001 (50次)** **RP5002 (100次)**

使用手册

2005年10月, 第3版



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



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 (RP5001)	100 次 (RP5002)
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)	15ml	25ml
	-20℃(长期)	<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	18ml RNase-free H ₂ O
		<i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>	
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个	100 个
RNase-free 过滤柱	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

注意事项

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。

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

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 RLS 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。

四、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. 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 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. 取含血凝块的全血 250 μ l (或 0.25g) 至 RNase-Free 过滤柱中, 13000rpm 离心 2 分钟, 收集下液, 加入 0.75ml 裂解液 RLS.
2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀, 在 15 -30 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 1mlRLS 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 $^{\circ}$ 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 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 500 μ l 去蛋白液 RE, 12,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液。
9. 加入 700 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。
10. 加入 500 μ l 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 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。

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℃或-70℃存放太久	存放时间过长可能降低 RN 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。

