



核酸提取试剂使用说明书

【产品名称】

产品通用名称：核酸提取试剂

产品商用名称：**通用植物microRNA提取试剂盒（离心柱型）**

【包装规格】

RP5331（50次）

【预期用途】

用于核酸的提取、富集、纯化等步骤。

【检验原理】

本产品是 BioTeke 自主开发的独特产品，其原理完全不同于异硫氰酸胍/酚/氯仿提取方法，克服了后者不能区分 RNA（本质上是多糖）和其他植物多糖的缺点，能高效将 RNA 和其他植物多糖分开，同时还能有效去除多酚和其他植物次级代谢成份，适合于绝大部分用 TRIZOL 和 QIAGEN Rneasy mini kit 无法提取的植物，并在近一百多种各类植物（包括十分棘手的松柏类植物）中得到验证。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，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（microRNA）从硅基质膜上洗脱。

【主要组成成分】

试剂盒由裂解液 PL，裂解液 MRL，漂洗液 RW，RNase-free H₂O，70%乙醇，RNase-free 吸附柱 RA，RNase-free 吸附柱 RB，收集管（2ml），使用说明书和合格证组成。主要组分及储存条件见表 1。

表 1 试剂盒组成、储存

试剂盒组成	RP5331	保存
裂解液 PL	55 ml	室温（-20℃长期）
裂解液 MRL	55 ml	4℃避光
漂洗液 RW	15 ml x 2	4℃（一个月）-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	20 ml	室温
70%乙醇	22.5ml RNase-free H ₂ O	室温
	<i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>	
RNase-free 吸附柱 RA	50 个	室温
RNase-free 吸附柱 RB	50 个	室温
收集管 (2ml)	100 个	室温

注：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！

【储存条件及有效期】

1、裂解液 MRL 和漂洗液 RW 在 2-8℃条件下保存；裂解液 PL 在-20℃条件下保存，其他试剂可常温保存。

2、本试剂盒有效期一年，请在有效期内使用。

3、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。

【适用仪器】

本产品可适用于匹配 1.5/2.0 ml 离心管的高速冷冻离心机,如百泰克 CR3180。

【样本要求】

新鲜或保存得当的植物样品。样本采集后尽快实验，可在 2~8℃暂时保存；若需长期保存，应置于-80℃环境中。

【使用方法】

*** 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!事先将裂解液 PL 65℃ 预热。**

1. 匀浆处理

取 50-100mg 植物组织于液氮中研磨，时间要短，要保持研钵中有液氮（如果没有液氮也可以直接加 1ml 的裂解液 PL 后匀浆。组织样品容积不能超过 PL 容积的 10%）。

2. 转移样品至 1.5ml RNase free 离心管中，加入 1ml 的裂解液 PL 颠倒混匀，在 65℃ 条件下孵育 10 分钟（期间颠倒混匀几次）以使核蛋白体完全分解。

3. 室温条件下 12,000rpm 离心 5 分钟，小心取上清转入一个新的 2ml RNase free 离心

管中。

4. 加入等体积事先预冷的异丙醇，颠倒混匀，4°C 12,000rpm 离心 5 分钟。
 5. 尽可能多的去除上清，小心不要倒掉沉淀，加入 100 μ l RNase-free H₂O 重新溶解沉淀。
 6. 加入 900 μ l 裂解液 MRL，混匀。
 7. 加入 200 μ l 氯仿，涡旋混匀，放置 2-3 分钟。
 8. 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。把水相(约 700 μ l)转移到新的 1.5ml RNase free 离心管中，进行下一步操作。
 9. 加入 0.6 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，分两次过柱)。
 10. 10,000rpm 离心 45 秒，收集下滤液(下滤液中含有 microRNA)到一个 2ml RNase free 离心管中，准确估计下滤液的体积(准确性非常重要)，加入 2/3 倍体积的无水乙醇，颠倒几次混匀，将混合液倒入到吸附柱 RB 中(吸附柱 RB 容量约为 700 μ l，所以要分几次离心加入同一吸附柱)，10,000rpm 离心 30 秒弃掉废液。
- 注：如果要分离大 RNA (18s 和 28s)，也可以从吸附柱 RA 中按照以下步骤得到。
11. 加入 700 μ l 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!)到吸附柱 RB 中，12,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
 12. 加入 500 μ l 漂洗液 RW，12,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
 13. 将吸附柱 RB 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 RB，放入一个 RNase free 离心管中，根据预期 microRNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l 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。收集得到纯净 microRNA 保存于 -20°C 或者更低。。

【产品性能指标】

1. pH 值:

在 25°C \pm 2°C 条件下测定，以下组分的 pH 值需满足下表要求:

组分名称	pH 值
裂解液 PL	8.5 \pm 0.2
裂解液 MRL	4.2 \pm 0.2
漂洗液 RW	7.5 \pm 0.2
RNase-free H ₂ O	7.0 \pm 0.2

70%乙醇	7.0± 0.2
-------	----------

【注意事项】

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PL、裂解液MRL、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. 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。

疑难解答：

产量低

1. 样品裂解或者匀浆不彻底
2. 使用的样品或者裂解物在 - 20℃或者 - 70℃存放太久。
3. 组织本身含RNA少
4. 超过了吸附柱的最大吸附能力
5. 漂洗液RW内忘记加乙醇

OD260/OD280吸光度比值 < 1.6

1. 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，OD280值会较高，造成比值低。
2. 污染了蛋白或者苯酚

RNA降解，完整性不佳

1. RNA提取所用各种物品和试剂没有灭活RNA酶
2. 组织取出后没有马上处理或冷冻，提取前已经降解
3. 提取的RNA样品没有保存在 - 20°C或 - 70°C低温
4. 样品提取过程中降解

【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：400-6788982

网址：www.bioteke.cn

【说明书核准及修改日期】

说明书修改日期 2019 年 06 月 03 日