通用型总 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

通用型总 RNA 提取试剂盒	5 次制备	50 次制备
Cat.No.	5010005	5010050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 收集管	5 个	50 个
RNase-free 1.5 ml 收集管	5 个	50 个
β-巯基乙醇	50 µl	500 µl
Buffer RDD	250 µl	2.5 ml
DNase I	28 µl	270 µl
Buffer RLA	4 ml	40 ml
Buffer RLK	3 ml	30 ml
Buffer WBR（浓缩液）	2 ml	20 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml×3
说明书	1 份	1 份

产品储存

DNase I请置于－20℃储存，其他试剂与物品储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品为客户提供了一套从动物组织、植物组织、培养细胞、细菌中小量提取高质量完整总 RNA 的解决方案（提取的 RNA≥200 nt，<200 nt 的 RNA 会被选择性的筛除）。试剂盒采用了独特的细胞裂解系统，无需使用苯酚、氯仿等有害物质，通过离心柱硅基质膜高效、专一地吸附核酸分子，再经过 DNA 酶处理去除基因组 DNA，最终得到高纯度的总 RNA。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇，可能需要胰蛋白酶、PBS 溶液（Simgen Cat. No. 9004500）、DEPC 水（Simgen Cat. No. 9003100）、溶菌酶（Simgen Cat. No. 8009100）
2. RNase-free 1.5 ml 离心管
3. 移液器及吸头（为避免 RNA 酶的污染，建议选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 旋涡振荡器，可能需要组织匀浆器、液氮及研钵、水浴锅
7. 无 RNA 酶使用的实验室

使用前准备

1. 每 1 ml Buffer RLA 中加入 10 µl β-巯基乙醇，混合均匀。此裂解液最好现用现配，加入 β-巯基乙醇的 Buffer RLA 最多能在 20℃保存一个月。
2. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
3. 因为唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在 RNA 提取的全过程中都戴乳胶手套和口罩。

操作步骤

在实验之前，请参照下表中所列的各种样品最适起始用量，进行裂解物制备。

表 1：不同样品最适起始用量和 Buffer RLA、Buffer RLK 的使用量

样品名称	样品起始用量	Buffer RLA 用量	Buffer RLK 用量
普通动物组织（肝脏、肾脏、心、肺、脑等）	5-20 mg	300 µl	300 µl
	20-40 mg	500 µl	500 µl
特殊动物组织（脾脏、胸腺等 DNA 含量高的组织）	5-10 mg	300 µl	300 µl
悬浮/贴壁细胞	5×10^4-5×10^6	300 µl	300 µl
植物组织（叶片、茎）	30-50 mg	300 µl	300 µl
	50-100 mg	500 µl	500 µl
细菌（OD_{600} 达 0.6-1.0）	1 ml	200 µl	300 µl

* 注意：在制备样品裂解物时，如果制备的裂解物很黏稠（如：脾脏、细胞）不易吸取时，可使用 20 G（或国产 9 号注射针头）的注射器来回吸放数次，以便于裂解物的吸取。

* 某些植物组织中多糖多酚含量较高，不适用本产品，推荐使用高多糖多酚植物总 RNA 试剂盒（Simgen Cat. No. 5103050）提取 RNA。

* 制备好的裂解物可以保存在 - 70℃以下备用。

1. 不同来源样本的处理

(1) 动物组织裂解物的制备：

必须使用新鲜或超低温冻存的组织。按照以下 A、B 两种方法中的任意一种进行裂解物的制备：

A. 匀浆法：迅速将组织放入 RNase-free 1.5 ml 离心管或匀浆管中，根据样品起始用量加入 Buffer RLA（按表 1 推荐用量），置于冰浴中，用组织匀浆器破碎细胞。

B. 液氮研磨法：迅速将组织投入到已加液氮的研钵中进行研磨，研磨过程中要不断补充液氮，以防组织融化，直至组织完全研磨成粉末状。将研磨成粉末状的样品迅速转移到 RNase-free 1.5 ml 离心管中称重，待剩余液氮将要挥发尽时加入 Buffer RLA（按表 1 推荐用量），用移液器反复吹打直到裂解物中无明显块状组织。

(2) 植物组织裂解物的制备：

必须使用新鲜或超低温冻存的组织。迅速将组织投入到已加液氮的研钵中进行研磨，研磨过程中要不断补充液氮，以防组织融化，直至组织完全研磨成粉末状。将研磨成粉末状的样品迅速转移到 RNase-free 1.5 ml 离心管中称重，待剩余液氮将要挥发尽时加入 Buffer RLA（按表 1 推荐用量），用移液器反复吹打直到裂解物中无明显块状组织。

* 尽量选取幼嫩组织提取 RNA，成熟或衰老的植物组织中 RNA 含量低，且含较多淀粉等多糖衍生物，可能会导致裂解产物呈现胶冻状，导致 RNA 提取失败。如果裂解产物呈现胶冻状，推荐使用高多糖多酚植物总 RNA 试剂盒（Simgen Cat. No. 5103050）提取 RNA。

(3) 细胞裂解物的制备：

① 贴壁细胞裂解物可按照以下 A、B 两种方法中的任意一种进行裂解物的制备：

A. 胰蛋白酶处理方法：

a. 倒掉培养液，用 PBS 溶液洗涤细胞，弃去 PBS 溶液，加入正好能盖住单层细胞的胰酶溶液：如 150 mm 培养瓶需加入 2 ml 胰酶溶液，100 mm 培养皿需加入 1 ml 胰酶溶液，轻轻晃动器皿使胰酶均匀分布在细胞层上，直到细胞松动（一般 1-2 分钟）。

b. 一旦细胞松动，尽快去除胰酶溶液（倾斜平皿或培养瓶以便用枪头尽量吸除多余的溶液），加入适量 PBS 溶液，用移液器吹下贴壁的细胞。

c. 将细胞连同 PBS 溶液一起收集到 RNase-free 1.5 ml 离心管中，300-500×g（~1100-1500 rpm）离心 5 分钟，弃上清，收集沉淀细胞。

* 液体较多时可分多次离心收集细胞；也可用大体积离心管离心收集细胞，但需在下一步操作完成后将细胞裂解物转移到 RNase-free 1.5 ml 离心管中。

d. 加入 Buffer RLA（按表 1 推荐用量），用移液器吸放打散细胞沉淀，混合均匀。

B. 刮取式分离方法：

a. 倒掉培养液，加入适量 PBS 溶液，用移液器吹打细胞，直到细胞全部脱离为止。对于贴壁牢固的培养细胞，可以用细胞刮刀剥离细胞。

b. 将细胞连同 PBS 溶液一起收集到 RNase-free 1.5 ml 离心管中，300-500×g（~1100-1500 rpm）离心 5 分钟，弃上清，收集沉淀细胞。

* 液体较多时可分多次离心收集细胞；也可用大体积离心管离心收集细胞，但需在下一步操作完成后将细胞裂解物转移到 RNase-free 1.5 ml 离心管中。

c. 加入 Buffer RLA（按表 1 推荐用量），用移液器吸放打散细胞沉淀，混合均匀。

② 悬浮细胞裂解物的制备：

a. 将细胞连同培养液一起收集到 RNase-free 1.5 ml 离心管中，300-500×g（~1100-1500 rpm）离心 5 分钟，弃上清，收集沉淀细胞。

* 液体较多时可分多次离心收集细胞；也可用大体积离心管离心收集细胞，但需在下一步操作完成后将细胞裂解物转移到 RNase-free 1.5 ml 离心管中。

b. 加入 Buffer RLA（按表 1 推荐用量），用移液器吸放打散细胞沉淀，混合均匀。

(4) 细菌裂解物的制备：

A. 将细菌培养至 OD_{600} 达 0.6-1.0，向 RNase-free 1.5 ml 离心管中加入 1 ml 细菌培养液，12000 rpm 离心 30 秒，小心地、尽可能多的去除上清，留下细菌沉淀。

* 某些二价阳离子会抑制溶菌酶的活性，如果细菌培养基中含有二价阳离子（如 MRS 培养基等），应在离心收集细菌后增加一次洗涤步骤：加入 1 ml 蒸馏水，旋涡振荡悬浮细菌后 12000 rpm 离心 30 秒，弃蒸馏水上清。

* 某些特殊细菌培养后会改变培养基 pH 值（如乳酸杆菌），抑制溶菌酶的活性，在离心收集细菌后也需要洗涤一次，方法同上。

B. 加入 50 µl DEPC 水重悬沉淀，再加入 50 µl 3 mg/ml DEPC 水配制的溶菌酶溶液，旋涡振荡混匀，37℃孵育 5-10 分钟。

* 革兰氏阴性菌的细胞壁较薄，可减少溶菌酶溶液的浓度至 0.4 mg/ml。

* 某些细胞壁较厚的细菌需要增加溶菌酶的浓度（20-100 mg/ml）及孵育时间（1-4 h）才能有效溶解，某些特殊细菌还需要搭配其他试剂才能被溶菌酶溶解（例如某些葡萄球菌需要搭配溶葡萄球菌酶）。

C. 加入 Buffer RLA（按表 1 推荐用量），用移液器吸放打散沉淀，混合均匀。

2. 根据表 1 加入对应体积的 Buffer RLK，盖上管盖，旋涡振荡混匀，室温静置 3-5 分钟。

* 如果样品（指动物组织和细胞）来源比较珍贵，可以在加入 Buffer RLK 后置于 70℃温育 3 分钟，能提高 RNA 的得率。

* 如果旋涡振荡以后还有块状沉淀，可用移液器反复吹打几次直至沉淀消失。

3. 动物组织、植物组织和细胞样本需以 12000 rpm 离心 5 分钟，小心吸取上清液到一个新的 RNase-free 1.5 ml 离心管中。细菌样本可不离心，直接进入下一步操作。

* 离心后，如果上清液表面形成一层固状物，只需在吸取上清液时用枪头将固状物拨到离心管一边即可。

4. **加入 0.5 倍上清液体积的无水乙醇，盖上管盖，旋涡振荡混匀，使液体成混浊状且有泡沫。**

* 如果旋涡振荡以后有块状沉淀，可用移液器反复吹打几次直至沉淀消失。无水乙醇必须与上清液彻底混匀，若混合不均匀会影响最终 RNA 得率。

5. **吸取 750 µl 混合液转移至核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 1 分钟。**
6. **弃滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，吸取剩余的混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 1 分钟。**

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

7. **弃滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，加入 600 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒，弃滤液。**

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. **将 45 µl Buffer RDD 与 5 µl DNase I 混合配成孵育液。**

* 用移液器轻轻吸打混匀，不要旋涡振荡。

* 本步骤中配置的孵育液为提取一管 RNA 的用量，孵育液现用现配。

9. **将 50 µl 孵育液加入到核酸纯化柱的膜中央，室温（20-30℃）静置 15 分钟。**
10. **加入 800 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**
11. **弃滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，加入 300 µl Buffer WBR，盖上管盖，最高速（≥13000 rpm）离心 1 分钟。**
12. **弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个新的 RNase-free 1.5 ml 收集管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 50~100 µl RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 1 分钟。**

* 注意：取出核酸纯化柱时不要让滤液触及核酸纯化柱底部，如果核酸纯化柱沾染有滤液，请弃尽滤液重新将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中最高速空离 1 分钟，再取出核酸纯化柱进行此操作步骤。

13. **弃核酸纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于－70℃以下备用。**

表 2：不同样品提取 RNA 参考得率

样品种类	样品名称	RNA 得率	A260/A230	A260/A280
动物组织	小鼠肝脏	3.0-5.5 µg/mg	2.0-2.5	1.9-2.1
	小鼠肾脏	1.5-3.0 µg/mg	2.0-2.5	1.9-2.1
	小鼠脾脏	1.5-3.5 µg/mg	2.1-2.6	1.9-2.1
	小鼠心脏	0.4-1.0 µg/mg	2.0-2.6	1.9-2.1
	小鼠肺	0.6-1.2 µg/mg	2.2-3.0	1.9-2.1
	小鼠脑	0.4-0.8 µg/mg	2.1-2.7	1.9-2.1
植物组织	番茄叶片	1.0-2.0 µg/mg	2.1-2.6	1.9-2.2
细胞	293T（1×10^6）	8-10 µg/次	2.0-2.3	1.9-2.1
	Hela cell（1×10^6）	20 µg/次	2.0-2.3	1.9-2.1
细菌	*E.Coli*（1×10^9）	30-50 µg/次	2.2-2.6	1.9-2.1