

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 Cat.No.	5 次制备 5010005	50 次制备 5010050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 离心管	5 个	50 个
β -巯基乙醇	50 μ l	500 μ l
Buffer RLA	4 ml	40 ml
Buffer RLK	3 ml	30 ml
Buffer WBR (浓缩液)	2 ml	20 ml
Buffer RDD	250 μ l	2.5 ml
DNase I	28 μ l	270 μ l
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml \times 3
说明书	1 份	1 份

产品储存

DNase I 请于 -20℃ 储存，其他试剂与物品如果储存于常温 (0~30℃)，可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上。

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、细菌中小量纯化高质量、完整总 RNA 的解决方案。该试剂盒采用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 的污染，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
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. 台式少量离心机 (可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子)
6. 水浴锅和旋涡振荡器
7. 无 RNA 酶使用的实验室
8. 可能需要 DEPC 处理水 (细菌样品用)

使用前准备

1. 将 β -巯基乙醇按 1% (V/V) 加入到 Buffer RLA 中 (比如 1 ml Buffer RLA 中加入 10 μ l β -巯基乙醇)，配制好的裂解液盖紧瓶盖并做好标记。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	样本起始用量	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 μ l	300 μ l
普通动物组织（肝脏、肾脏、心、肺、脑等）	20-40 mg	500 μ l	500 μ l
特殊动物组织（脾脏等）	5-10 mg	300 μ l	300 μ l
悬浮/贴壁细胞	1.5×10^3 - 5×10^6	300 μ l	300 μ l
植物组织（叶片、茎）	30-50 mg	300 μ l	300 μ l
植物组织（叶片、茎）	50-100 mg	500 μ l	500 μ l
细菌（OD ₆₀₀ 达 0.6-1.0 时）	0.5 ml	200 μ l	300 μ l

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

* 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℃ 备用。

1. 不同来源样本的处理

(1) 动物组织裂解物的制备：

按照以下 A、B 两种方法进行裂解物的制备：

- A. 必须使用新鲜或超低温冻存的组织。迅速将组织放入 RNase-free 1.5 ml 离心管或匀浆管中，按起始用量加入 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. 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 离心管中称量，待剩余液氮将要挥发尽时加入 Buffer RLA（按表 1 推荐用量），用移液枪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 离心管中称量，待剩余液氮将要挥发尽时加入 Buffer RLA（按表 1 推荐用量），用移液枪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，推荐选择高多糖多酚植物总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 两种方法进行裂解物的制备：

A. 胰蛋白酶处理方法

- a. 倒掉培养液，用无菌 1×PBS 溶液洗涤细胞，然后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使用枪头尽量去除多余的溶液），加入1×PBS溶液，用移液枪吹下贴壁的细胞。
- 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。
- d. 加入Buffer RLA（按表1推荐用量），用移液枪吸放打散沉淀，混匀，并将裂解物转移至1.5 ml离心管中。

B. 刮取式分离方法：

- a. 倒掉培养基，加入适量无菌1×PBS溶液，用移液枪吹打细胞，直到细胞全部脱离瓶底为止。对于贴壁牢固的培养细胞，可以用细胞刮勺剥离细胞。
- b. 将细胞连同PBS溶液洗涤沉淀的细胞，300-500×g（~1100-1500 rpm）离心5分钟，弃上清，收集沉淀细胞。
- c. 加入Buffer RLA（按表1推荐用量），用移液枪吸放打散沉淀，混匀，并将裂解物转移至1.5 ml离心管中。

② 悬浮细胞裂解物的制备：

- A. 将悬浮的细胞连同培养液一起倒入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。
- B. 加入Buffer RLA（按表1推荐用量），用移液枪吸放打散沉淀，混匀，并将裂解物转移至1.5 ml离心管中。

(4) 细菌裂解物的制备：

- A. 将细菌培养至OD₆₀₀达0.6-1.0，向1.5 ml离心管中加入0.5 ml细菌培养液，12000 rpm离心30秒。
- B. 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。
- C. 加入50 μl DEPC处理水重悬沉淀，再加入50 μl 3 mg/ml DEPC处理水配制的溶菌酶溶液，旋涡振荡混匀，37℃孵育5-10分钟。
 - * 革兰氏阴性细菌的细胞壁较薄，可减少溶菌酶溶液的浓度至0.4 mg/ml。
- D. 加入Buffer RLA（按表1推荐用量），用移液枪吸放打散沉淀混匀，并将裂解物转移至1.5 ml离心管中。

2. 根据表1，按照所用样品的起始用量加入对应体积的Buffer RLK，旋涡振荡混匀，室温放置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，可用移液枪反复吹打几次直至沉淀消失。

3. 动物组织裂解物、植物组织裂解物和细胞裂解物混匀后以12000 rpm离心5分钟，小心吸取上清液转移到一个洁净的1.5 ml离心管中。细菌裂解物则直接进行下一步操作，不用离心。

- * 离心后，如果在上清液表面形成一层固状物，只要在吸取上清前用枪头将固状物拨到离心管一边即可。

4. 加入0.5倍上清体积的无水乙醇，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，可用移液枪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，若混匀不均会影响最终RNA得率。

5. 吸取 750 μ l 混合液转移至核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 离心管中），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 离心管中，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，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心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 离心管中，加入 600 μ l 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 μ l Buffer RDD 与 5 μ l DNase I 混合配成孵育液。
 - * 用移液枪轻轻吸打混匀，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 μ l 孵育液加入到纯化柱膜中央，室温静置 15 分钟。
10. 加入 800 μ l 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 离心管中，加入 300 μ l Buffer WBR，盖上管盖，最高速 (≥ 13000 rpm) 离心 1 分钟。
12. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 RNase-free 1.5 ml 离心管中，在纯化柱膜中央加入 50~100 μ l 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 离心管中最高速空离 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°C 以下备用。

表 2. 不同材料提取 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 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2.0-2.5	1.9-2.1
	小鼠肾脏	1.5-3.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2.0-2.5	1.9-2.1
	小鼠脾脏	1.5-3.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2.1-2.6	1.9-2.1
	小鼠心脏	0.4-1.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2.0-2.6	1.9-2.1
	小鼠肺	0.6-1.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2.2-3.0	1.9-2.1
	小鼠脑	0.4-0.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2.1-2.7	1.9-2.1
植物组织	番茄叶片	1.0-2.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2.1-2.6	1.9-2.2
细胞	293T (1×10^6)	8-10 $\mu\text{g}/\text{次}$	2.0-2.3	1.9-2.1
	Hela cell (1×10^6)	20 $\mu\text{g}/\text{次}$	2.0-2.3	1.9-2.1
细菌	<i>E. Coli</i> (1×10^9)	30-50 $\mu\text{g}/\text{次}$	2.2-2.6	1.9-2.1