

RNA-Quick Purification Kit

(RNA 快速提取试剂盒)

使用说明书

货号：RN001

产品简介

本试剂盒可以从少量的生物样品中快速提取高质量的总 RNA，具有操作简单快速，性能可靠，不使用酚、氯仿等有毒物质的优点。本产品适用于细胞、特定类型的动物组织的 RNA 提取，提取得到的总 RNA 可用于 RT-PCR、RT-qPCR、Northern blotting、cDNA 文库构建等多种实验。本试剂盒提供的裂解液（Lysis Buffer）中含有强变性剂，能够迅速裂解样品并失活 RNA 酶，确保操作过程中 RNA 的完整性。本试剂盒大致的操作过程如下：首先用裂解液裂解样品；裂解好的样品加入乙醇混匀即可上柱，离心去掉液体将 RNA 结合在柱子上；杂质在清洗过程中被有效去除；洗脱 RNA 并用于下游实验。

产品内容

组分	RN001 (100 次)
Lysis Buffer	60 ml
Wash Buffer*	12 ml
Elution Buffer	25 ml
RNA 纯化柱（带收集管）	100 套

*第一次使用前，须向 Wash Buffer 中加入 48 ml 无水乙醇。

保存条件

Elution Buffer 需要分装成小份室温保存，其余试剂和 RNA 柱室温保存（使用中谨防试剂被污染）。（附赠的 DNA 酶收到后需置于 -20 °C 保存。）

关于试剂盒的适用性

本产品仅用于科研，请勿用于医药、临床治疗、化妆品及食品等用途

用于细胞样品时建议用 6 孔板或 35 mm 培养皿培养细胞，培养至合适的密度进行 RNA 提取(24 孔板培养的细胞培养至 90%以上的细胞密度也可使用)。不建议用 100 mm 培养皿培养的细胞直接进行 RNA 提取，否则可能导致细胞裂解不充分或因核酸过量导致离心柱堵塞或导致基因组残留。

用于组织样品时建议用于内脏组织、肿瘤组织等，不适用于皮肤等坚韧的组织。
该试剂盒可提取 5~300 万常规细胞或 1~100 mg 组织的 RNA，对于 T 细胞/B 细胞等体积很小、RNA 含量很低的细胞，建议增加细胞数到至少 100 万以上。

操作步骤

样品裂解

1A. 对 $\leq 3 \times 10^6$ /孔的贴壁细胞：

- a) 吸干培养基，用适量的 PBS 洗一次；
- b) 加入 500 μ l 的 Lysis Buffer，用力吹吸 10 次，转移至 EP 管中，vortex 10 秒钟以充分裂解细胞；

1B. 对 $> 3 \times 10^6$ /孔的贴壁细胞或悬浮细胞：

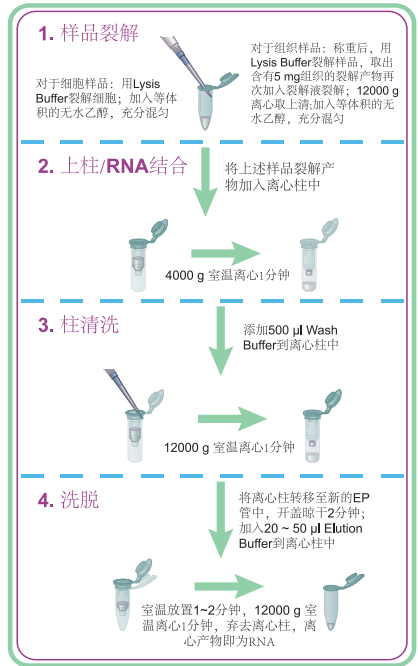
- a) (本步适用于贴壁细胞。对于悬浮细胞，从步骤 b 开始操作) 用胰酶消化将贴壁细胞悬浮起来；
- b) 取含 1×10^6 个细胞的悬液至 1.5 ml 离心管，500 g 离心 3 分钟以沉淀细胞；
- c) 小心吸干上清，注意不要吸到细胞，以免细胞丢失；
- d) 加入 500 μ l 的 Lysis Buffer，用力吹吸 10 次，vortex 10 秒钟；

1C. 对动物组织 (适用于内脏组织、肿瘤组织等，不适用于皮肤等坚韧的组织)：

- a) 切取 1 ~ 100 mg 的组织小块至称过重的 1.5 ml 离心管，称量得到组织重量。加入 300 μ l 的 Lysis Buffer；
- b) 用研磨棒或匀浆机匀浆。当组织块重量大于 5 mg 时，从匀浆液中取出一部分，其中含有 5 mg 的组织；
- c) 向取出的匀浆液中加入 Lysis Buffer，补足到 300 μ l。再次研磨之后漩涡震荡 10 秒钟，以充分裂解组织；
- d) 12,000 $\times$ g 离心 2 分钟，将上清转移到新的 1.5 ml 离心管中；

上柱/RNA 结合

实验流程图



- 向裂解的细胞或组织中加入等体积的无水乙醇充分混匀（可能会产生沉淀，这是正常现象，继续进行操作即可）。可将离心管颠倒几次，或用移液器用力吹吸 10 次使可能产生的沉淀分散开，然后将液体加入离心柱。
- 4,000 × g 离心 1 分钟（对于细胞数大于 1.5×10^6 的细胞样品或组织样品，建议 12,000 × g 离心）。**可选操作**：若实验对基因组的少量残留极其敏感，可用试剂盒附赠的 DNA 酶处理，具体处理方法详见最后一页：【常见问题及解决方案】第 5 条。

柱清洗

- 向 RNA 柱中加入 500 μl 的 Wash Buffer，12,000 × g 离心 1 分钟（离心结束后取出柱子时注意不要让收集管内的废液接触到 RNA 柱，以免污染。可以倒掉废液，将 RNA 柱装回收集管，空管离心一次，能完全去除可能残留的 Wash Buffer。若按标准步骤提取的 RNA 纯度不够时可采用此方法优化）。
- 将柱子放到干净的无 RNA 酶的 1.5 ml 离心管上，开盖晾干 2 分钟。

RNA 洗脱

- 在 RNA 柱的膜中心部位加入 20 ~ 50 μl 的 Elution Buffer，室温静置 2 分钟。
- 12,000 × g 离心 1 分钟（洗脱下来的 RNA 溶液重新加入柱中，静置 5 分钟，再次离心可提高洗脱效率，得到更多 RNA）。（RNA 洗脱下来后，建议置于冰上。）
- 测定洗脱的 RNA 浓度，以便于后续实验使用。提取出来的 RNA 可立即用于后续实验，也可保存在 -80 °C 备用。

关于 RNA 浓度与纯度：本试剂盒提取的 RNA，使用 Nanodrop 等微量分光光度计测定 OD 260/280 在 1.90~2.2 之间均属正常（因不同仪器之间存在误差，若 OD 比值略有超出，但上下不超过 0.1，且吸光度曲线正常，则亦可接受）。经检测，对于少量细胞或组织样品，使用本试剂盒提取的 RNA 浓度最低不低于 30ng/μl 即可使用。

实验结果示例

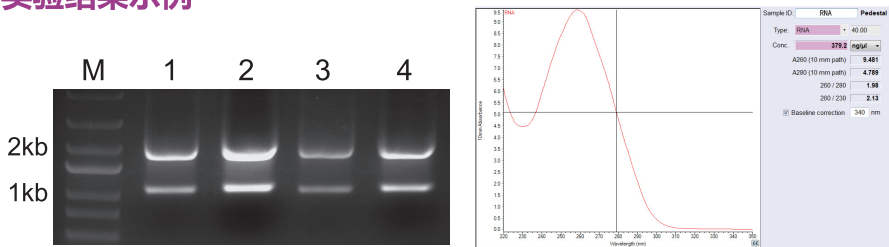


图 1. 本试剂盒与 TRIzol 法从不同数量的 293T 细胞中提取的 RNA 电泳对比（50 μl 洗脱，上样量 5 μl）。M：250bp DNA Ladder；泳道 1、2：本产品提取 3×10^5 和 6×10^5 细胞；泳道 3、4：TRIzol 提取 3×10^5 和 6×10^5 细胞。可见，本试剂盒提取 RNA 的产量高于 TRIzol 法。图 2. 本试剂盒提取的 RNA 用 Nanodrop 测得的

浓度和 OD260/280 吸光度比值。以上结果表明本试剂盒可以很好的替代 TRIzol 法进行常规的 RNA 提取，而且提取效率高于 TRIzol 法，同时具有较高的纯度。

常见问题及解决方案

RNA 产量过低，或用已经验证过的引物检测基因表达，检测到的内参基因 Ct 值偏大，或无法做出正常的扩增结果。

解决办法：

a.检查所使用的试剂是否受到污染：建议试剂盒开封后，每种 buffer 分装为 2 份（可用 15 / 50 毫升离心管分装），每次使用时应严格按照规范操作，防止交叉污染。

b.溶解好的引物应该分装为小份冻存，以减少引物降解及降低污染的可能性。

c.检查操作流程是否正确。例如：

1.整个 RNA 提取的操作过程必须在室温进行，不可置于冰上（直至洗脱离心后得到 RNA 方可置于冰上），以避免其间产生不溶物堵塞离心柱；

2.Wash Buffer 使用前需加入 48 毫升无水乙醇混匀才可使用；

3.组织样品裂解前须称重，如果超过 5 mg 需要研磨两次（详见操作步骤），用 Vortex 充分振荡混匀，高速离心取上清；

4.细胞或组织裂解产物，上柱前需要加入等体积的无水乙醇，充分混匀后加入离心柱中离心；

5.可选步骤：若实验对基因组的少量残留极其敏感，可用试剂盒附赠的 DNA 酶处理：RNA 上柱 4000 g 离心弃去液体后，按照每个样品 2 μ l DNase 加 10 μ l ddH₂O（或 Elution Buffer），混匀后向每个离心柱中央加 12 μ l，室温放置 5 分钟，然后加入 Wash Buffer，进行后续操作；

6.洗涤时需用 12,000 g 高速离心充分去除 Wash Buffer，然后开盖晾干 2 分钟；

7.洗脱液的体积可以根据需要在一定范围内调整（一般 20~50 μ l，最少不可少于 10 μ l，否则无法充分溶解 RNA），以浓度满足后续实验需求为宜。重复洗脱一次及延长放置时间至 5 分钟均可提高 RNA 产量。

8.若细胞体积较大，以往采用 TRIzol 试剂提取 RNA 时需用 100 mm 培养皿培养细胞，建议使用本试剂盒时仍然使用 35 mm 培养皿培养细胞，本试剂盒最低可以提取 5 万个左右常规细胞的 RNA（T、B 细胞等体积极小的细胞除外），能满足绝大多数逆转录和 qPCR 的实验需要。经测试，本试剂盒最多大约可提取 30 μ g 左右的总 RNA。