



【产品名称】

粪便总 RNA 快速提取试剂盒（离心柱型）

【包装规格】

RP8001 (50 次) RP8002 (100 次)

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50 次 (RP8001)	100 次 (RP8002)
裂解液 DL	室温	55 ml	110 ml
蛋白沉淀液	室温	25ml	50ml
去蛋白液 RE	室温	30ml	60ml
漂洗液 RW	4℃一个月 (-20℃长期)	15 ml	25 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10ml	20ml
70%乙醇	室温	22.5ml RNase-free H ₂ O	45mlRNase-free H ₂ O
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free 吸附柱 RA	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。
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。
5. 裂解液 DL 使用前加入 β-巯基乙醇至终浓度 4%。

二、原理简介

独特的裂解液裂解细胞和灭活 RNA 酶,然后基因组和 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. 稳定性好、纯度高、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. 多次漂洗去蛋白过程，提取基因组和 RNA 纯度更高。

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 DL 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. 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。

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. 研磨处理（裂解液 DL 使用前加入 β-巯基乙醇至终浓度 4%）

每50~100mg样品用液氮研磨后转移至离心管中，加入1ml的裂解液。样品容积不能超过DL容积的10%。
2. 将样品剧烈震荡混匀，在 37℃ 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。
3. 每 1mlDL 加 500ul 蛋白沉淀液。盖紧样品管盖，剧烈振荡 15 秒，4℃ 的条件下 12，

000rpm 离心 5 分钟，小心取上清转入一个新的 RNase free 的离心管中。

4. 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），溶液太多可以分次过柱。
5. 10, 000rpm 离心 45 秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
6. 加 500 μ l 去蛋白液 RE，12, 000rpm 离心 45 秒，弃掉废液。
7. 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。
8. 加入 500 μ l 漂洗液 RW，12, 000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
9. 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。**
10. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，根据预期基因组和 RNA 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 1 分钟，12, 000 rpm 离心 1 分钟收集即可得到总核酸。

注意：洗脱得到的溶液含有 DNA 和 RNA，如果需要消化 DNA，可在提取后用 DNA 酶进行消化，也可在提取步骤中加入 DNA 酶消化，参考步骤如下：

过柱消化液的配置，每柱需消化液 30 μ l。

RQ1 RNase-Free DNase(Promega Cat#M6101) 2-5 μ l（根据 DNA 量多少，1 μ l 可以消化 1 μ g 的 RNA）

RQ1 DNase 10 \times Reaction Buffer 3 μ l

RNase-Free Water total to 30 μ l

在步骤 7-8 之间加入以下步骤：

7-1. 加入已配置好的消化液 30 μ l 于吸附膜的中间部位，37°C 保温 20-30 分钟。

7-2. 加入 500 μ l 去蛋白液 RE，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 45 秒，弃掉废液。接着步骤 8-10 即可。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
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 DL 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，直接在干净研钵内加入适量裂解液 DL 直接研磨。

	使用的样品或者裂解物在-20℃或者-70℃存放太久	存放时间过长可能降低 RNA 产量，应尽快处理样品或者裂解物。
	样本本身含 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
	污染了蛋白或者苯酚	
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 9, 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 9, 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。