



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2018-05-29

动物组织/细胞总RNA快速提取试剂盒

Animal tissue/Cell Total RNA Kit (离心柱型)

目录号: ZP404

试剂盒组成	ZP404-1 50次	ZP404-2 100次
细胞裂解液R	50 ml	100 ml
漂洗液RW(加乙醇后使用)	15 ml	2×15 ml
RNase-free ddH ₂ O	10 ml	20 ml
RNase-free 吸附柱	50 个	100 个
RNase-free收集管 (2 ml)	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

■ 储存条件

1. 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°C水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 室温下 (15°C—25°C) 运输和储存, 裂解液R可以常温运输, 收到后4°C避光保存。
3. 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。

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.



■ 产品介绍

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活RNA酶，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从硅基质膜上洗脱。

■ 产品特点

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. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法，试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，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. 独有的R裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取RNA纯度更高。
5. 有效的去除了5S在总RNA中含量，提高了纯度。

■ 注意事项

1. 第一次使用前请先在漂洗液RW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. 为防止RNA降解，所有离心步骤如未加说明，均在4°C低温进行，使用转速可以达到13000rpm的冷冻离心机即可。
3. 裂解液R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。**
4. 本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，用户使用前需要自备氯仿。
5. 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。
6. 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。
7. 加入裂解液R匀浆后，加氯仿前，样品可在 -60°C~-70°C 保存一个月以上。



■ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入指定量乙醇！

1. 匀浆处理

a. 组织

用玻璃或强力匀浆器搅匀组织样品，保存于液氮内样品需要用研钵磨碎，每50~100mg组织加1ml的细胞裂解液R后匀浆。组织样品容积不能超过细胞裂解液R容积的10%。

注意：对于核酸含量丰富的组织（如肝、脾等），建议样品用量在20-50mg，避免样品过多影响提取效果。

b. 单层生长的细胞

直接往直径3.5cm的培养板中加入1ml的细胞裂解液R溶解细胞，并用移液枪轻轻吹打混匀。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的细胞裂解液R量（每10cm²加1ml）。一般情况下，普通大小的细胞培养瓶，加入1ml的细胞裂解液R，迅速轻摇使细胞裂解液R充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活RNA酶，轻轻用移液枪反复吹打混匀。当细胞裂解液R量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

c. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在细胞裂解液R试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。每5~10×10⁶的动物细胞，植物或酵母菌细胞或每1×10⁷细菌加1ml的细胞裂解液R。在加入细胞裂解液R前应避免洗涤细胞，否则会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀（涡旋亦可），在15-30°C条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。

3. **可选步骤：**4°C的条件下12000rpm离心10分钟，小心取上清转入一个新的RNase-free的离心管中。

注：当样品富含蛋白质、脂肪、多糖或是细胞外物质例如肌肉、脂肪组织或植物的块茎部分时可能需要这一分离步骤。匀浆化后在2~8°C的条件下以12000rpm离心10分钟，移除匀浆中不溶解的物质，余下的沉淀中包含有细胞外膜、多糖以及高分子量DNA，而上层的超浮游物含有RNA。

4. 每1ml细胞裂解液R加0.2ml氯仿，盖紧样品管盖，剧烈振荡（涡旋亦可）15秒并将其在室温下孵育3分钟。

5. 于4℃ 12000rpm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。水相层的容量大约为所加细胞裂解液R体积的60%，把水相转移到新管中，进行下一步操作。

建议：① 分层后细胞裂解液对RNA的保护作用减弱，因此操作上快些低温更好。

② 由正中插入液面下缓慢吸取大约460μl上相，避免扰动带RNase的中间层。

一般吸取大约500μl上相即可，不必要尽可能多的吸取含RNA的水相。

6. 加入0.5倍体积**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中，吸附柱套在收集管内。

7. 12000rpm离心45秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。

8. 加入500μl漂洗液RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12000rpm离心45秒，弃掉废液。

9. 加入500μl漂洗液RW，12000rpm离心45秒，弃掉废液。

10. 将吸附柱放回空收集管中，13000rpm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。

11. 取出吸附柱，放入一个RNase-free离心管中，根据预期RNA产量在吸附膜的**中间部位**加50-100μl RNase-free water，室温放置2分钟，12000rpm离心1分钟。**洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要RNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于30μl，体积过小降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。**

12. 电泳推荐方案：用3mm×1mm小梳子，初始量为5μl电泳。

电泳电压4-10v/cm，电泳时间20-25分钟。

■ 问题与解决方法

问题	评论与建议
RNA产量低	<ul style="list-style-type: none"> * 样品裂解或者匀浆不彻底。建议：液氮研磨的时候尽量研磨完全，加入裂解液R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，在干净研钵内加入适量裂解液R直接研磨。 * 使用的样品或者裂解物在-20℃或者-70℃存放太久。建议：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。 * 组织本身含RNA少。建议：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。建议：同一个样品使用多个吸附柱，然后合并得到RNA。 * 漂洗液RW内忘记加乙醇。建议：第一次实验时，漂洗液RW瓶中加入指定量无水乙醇。
OD_{260}/OD_{280} 吸光度比值<1.6	<ul style="list-style-type: none"> * 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。建议：检测时用TE稀释样品。 * 污染了蛋白或者苯酚。建议：做步骤5吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相和下层有机相，确保做了步骤10。
下游的RT-PCR实验不成功	<ul style="list-style-type: none"> * 忘记做步骤10，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。建议：确保做了步骤10，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。

■ 问题与解决方法

问题	评论与建议
基因组 DNA污染	<ul style="list-style-type: none"> * 起始样品量超出了裂解液R的处理范围。建议: 选择合适的起始处理量。 * 样品中含有有机溶剂(如乙醇、DMSO等), 强缓冲液或碱性溶液。建议: 避免这些可以改变裂解液R性质或者PH值的物质。 * 吸取上清时吸入了中间相。建议: 做步骤5吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相。
RNA降解, 完整性不佳	<ul style="list-style-type: none"> * RNA提取所用各种物品和试剂没有灭活RNA酶。建议: 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。建议: 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°C。 * 提取的RNA样品没有保存在-20°C或-70°C低温。建议: 尽可能的将RNA保存在-70°C的低温。 * 样品提取过程中降解。建议: 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。