



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2025-12-03

# 通用型总RNA快速提取试剂盒 (DNase I)

## Universal Total RNA Kit(DNaseI)

目录号:ZP443

试剂盒组成	ZP443-1 50次	ZP443-2 100次
裂解液R	50 ml	100 ml
氯仿替代物	10 ml	20 ml
去蛋白液RW1	40ml	80ml
DNase I(2U/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l
DNase Buffer	5ml	10ml
漂洗液RW	15 ml	2 $\times$ 15 ml
RNase-free ddH <sub>2</sub> 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

裂解液R 2~8°C避光, DNase Buffer 2~8°C&-20°C, DNase I -20°C, 其余组分室温。

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

本试剂盒可以从动植物组织、血液、培养细胞及各种微生物样品中裂解提取总RNA。改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解液细胞和灭活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，对微量DNA敏感的实验，可以增加DNase I柱上消化步骤，最后低盐的RNase-free water将纯净RNA从硅基质膜上洗脱，提取到的RNA可以直接应用于RT-PCR、RT-qPCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译、芯片分析等多种下游实验。

## ■ 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，可以有效的消除大部分基因组污染；配合DNase I柱上消化，消除掉残留的微量DNA。
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、氯仿替代物以及去蛋白液RW1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. 操作人员应按照RNA实验要求，佩戴口罩和手套，使用RNase-free的耗材和试剂，并保证无RNase的操作环境。
5. 应取新鲜样品，并避免反复冻融，否则可能降低RNA的质量和产量。
6. 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。
7. 加入裂解液R匀浆后，加氯仿替代物前，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中加入指定量乙醇！

### 1. 样本处理：

**1a：植物组织：**每20-80mg幼嫩植物组织加1ml裂解液R，用研磨杵将组织彻底研磨（如组织较难彻底研磨，可选用电动或玻璃匀浆器）；或者取30-80mg幼嫩植物组织加液氮彻底研磨后，转入到已经加有1ml植物裂解液R的1.5ml离心管中，涡旋振荡混匀。

**1b：动物组织：**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破碎，每50~100mg组织加1ml的裂解液R后匀浆。组织样品容积不能超过裂解液R容积的10%。

**注：**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。

**1c：单层生长的细胞：**直接往直径3.5cm的培养板中加入1ml的裂解液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裂解液R量(每10cm<sup>2</sup>加1ml)。一般情况下，普通大小的细胞培养瓶，加入1ml的裂解液R，迅速轻摇使裂解液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。当裂解液R量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

**1d：悬浮生长的细胞：**通过离心来沉淀细胞。在裂解液R试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。每5~10×10<sup>6</sup>的动物细胞，植物或酵母菌细胞或每1×10<sup>7</sup>细菌加1ml的裂解液R。在加入裂解液R前应避免洗涤细胞，否则会增加mRNA降解的可能性。

**注：**破裂某些酵母菌和革兰氏阳性细菌可能需要使用匀浆或者酶处理，可联系我司寻求技术支持。

**1e：血液：**直接取新鲜的血液，加入3倍体积的裂解液R（推荐0.25ml全血加入0.75ml裂解液R），充分振荡混匀。

**注：**分离白细胞后再提取可以获得更高的RNA产量，可以联系我司获取红细胞裂解液。

2. 将匀浆样品室温静置5分钟，使得核酸蛋白复合物完全分离。

3. 可选步骤：4℃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裂解液R加0.2ml氯仿替代物。盖紧样品管盖，剧烈振荡（涡旋亦可）10秒并将其在室温下孵育2分钟。
  5. 于4°C 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 分层后裂解液对RNA的保护作用减弱，因此操作上低温快速更好。
- ② 由正中插入液面下缓慢吸取大约500μl上相，避免扰动带RNase的中间层。一般吸取大约400-500 μl上相即可，不必要尽可能多的吸取含RNA的水相。
6. 加入0.5倍体积的**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30秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
  8. 向吸附柱中加入350μl去蛋白液RW1，12000rpm 离心30秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
  9. 向柱内悬滴80μl DNase I工作液，室温消化5min(不要离心)。(DNaseI工作液配方:78μl DNase Buffer+2μl DNaseI，临用临配)
  10. 继续加入350μl去蛋白液RW1，12,000rpm离心30s，弃废液，将吸附柱重新套回收集管。
  11. 加入500μl 漂洗液RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），12000rpm离心30秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
  12. 重复步骤11。
  13. 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。
  14. 取出吸附柱，放入一个新的RNase-free离心管中，根据预期RNA产量在吸附膜的中间部位加60-100μl RNase-free water，室温放置2分钟，12000rpm离心1分钟，得到RNA溶液。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50μl，体积过小降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。
  15. 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"> <li>* 样品裂解或者匀浆不彻底。<b>建议：</b>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。</li> <li>* 使用的样品或者裂解物在-20°C或者-70°C存放太久。<b>建议：</b>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。</li> <li>* 组织本身含RNA少。<b>建议：</b>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。</li> <li>* 超过了吸附柱的最大吸附能力。<b>建议：</b>同一个样品使用多个吸附柱，然后合并得到RNA。</li> <li>* 漂洗液RW内忘记加乙醇。<b>建议：</b>第一次实验时，漂洗液RW瓶中加入指定量无水乙醇。</li> </ul>
$OD_{260}/OD_{280}$ 吸光度比值<1.6	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 分光光度计检测吸光度时，RNA样品溶于水。低离子浓度和低pH条件下，<math>OD_{280}</math>值会较高，造成比值低。<b>建议：</b>检测时用TE稀释样品。</li> <li>* 蛋白或者苯酚污染。<b>建议：</b>做步骤4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9。</li> </ul>
下游的RT-PCR实验不成功	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 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。<b>建议：</b>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。</li> </ul>

## ■ 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"> <li>* 起始样品量超出了裂解液R的处理范围。<b>建议:</b> 选择合适的起始处理量。</li> <li>* 样品中含有有机溶剂(如乙醇、DMSO等), 强缓冲液或碱性溶液。<b>建议:</b> 避免这些可以改变裂解液R性质或者PH值的物质。</li> <li>* 吸取上清时吸入了中间相。<b>建议:</b> 做步骤4吸取取上清水相的时候小心不要吸取到中间相。</li> </ul>
RNA降解, 完整性不佳	<ul style="list-style-type: none"> <li>* RNA提取所用各种物品和试剂没有灭活RNA酶。<b>建议:</b> 按照注意事项准备RNA提取的各种用品。</li> <li>* 组织取出后没有马上处理或冷冻, 提取前已经降解。<b>建议:</b> 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。</li> <li>* 提取的RNA样品没有保存在-20°C或-70°C低温。<b>建议:</b> 尽可能的将RNA保存在-70°C的低温。</li> <li>* 样品提取过程中降解。<b>建议:</b> 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。</li> </ul>



扫一扫 关注我们