



**北京博凌科为生物科技有限公司**

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: [blkwbio@blkwbio.com](mailto:blkwbio@blkwbio.com)

- ◆ RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒
- ◆ 目录号 1103
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

---

## RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒

目录号: 1103

目录编号	包装单位
110301	20次
110302	50次

❖ 适用范围:

适用于快速提取各种动植物细胞/组织高纯度总 RNA

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	20次	50次
裂解液 RL	4℃避光	25 ml	50 ml
去蛋白液 RE	室温	15 ml	25 ml
漂洗液 RW	室温	5 ml	10 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	10 ml	10 ml
70%乙醇	室温	4ml RNase-free H <sub>2</sub> O	9ml RNase-free H <sub>2</sub> O
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free 吸附柱 RA	室温	20 个	50 个
收集管 (2ml)	室温	20 个	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

---

储存事项:

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℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 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。裂解液 RL 可以常温运输，收到后 **4℃ 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。

❖ **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，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。

❖ **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 RL 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. 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。
3. 裂解液RL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。**
4. 考虑到环保问题，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OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>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OD<sub>280</sub>升高，从而使比值降低。
7. 加入裂解液RL匀浆后，加氯仿前，样品可在 -60℃-70℃ 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 瓶和 70%乙醇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的裂解液RL后匀浆。组织样品容积不能超过RL容积的10%。

b. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入1ml的RL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RL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RL, 迅速轻摇使RL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RL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RL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RL。在加入RL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, 在15 -30 ℃条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。

3. **可选步骤:** 4 ℃的条件下12, 000rpm 离心10分钟, 小心取上清转入一个新的RNase free的离心管中。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一额外的分离步骤。匀浆化后在2~8 ℃的条件下以12,000rpm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1mlRL加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡15秒并将其在室温下孵育3分钟。
  5. 于4℃ 12, 000rpm 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RL体积的60%，把水相转移到新管中，进行下一步操作。
  6. 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）。
  7. 12, 000rpm 离心45秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
  8. 加500μl 去蛋白液RE，12, 000rpm 离心45秒，弃掉废液。
  9. 加入500μl漂洗液RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm 离心45秒，弃掉废液。
  10. 加入500μl漂洗液RW，12,000 rpm 离心45秒，弃掉废液。
  11. 将吸附柱RA放回空收集管中，13,000 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。
  12. 取出吸附柱RA，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50-80μl RNase free water（事先在 65-70℃水浴中加热效果更好），室温放置2分钟， 12,000 rpm 离心1分钟。如果需要较多RNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心1分钟,或者另外再加30μl RNase free water，离心1分钟，合并两次洗脱液。

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 30μl，体积过小降低 RNA 洗脱效率，减少 RNA 产量。

---

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
RNA 产量低	<p>*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 RL 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, SK 在干净研钵内加入适量裂解液 RL 直接研磨。</p> <p>*使用的样品或者裂解物在-20℃或者-70℃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</p> <p>*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。</p> <p>*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。</p> <p>*去蛋白液 RE 和漂洗液 RW 内忘记加乙醇-<b>建议</b>: <b>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。</b></p>
OD260/OD280 吸光度比值<1.6	<p>*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, OD280 值会较高, 造成比值低。-<b>建议</b>: 检测时用 TE 稀释样品</p> <p>*污染了蛋白或者苯酚-<b>建议</b>: 做步骤 5 吸取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 8。</p>
下游的 RT-PCR 实验不成功	<p>*忘记做步骤 11, 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 11, 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。</p>

---

问题	评论与建议
基因组 DNA 污染	<p>*起始样品量超出了裂解液 RL 的处理范围-<b>建议</b>：选择合适的起始处理量。</p> <p>*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 RL 性质或者 PH 值的物质。</p> <p>*吸取上清时吸入了中间相-<b>建议</b>：做步骤 5 吸取上清水相的时候小心不要吸收到中间相。</p>
RNA 降解， 完整性不佳	<p>* 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。</p> <p>*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℃。</p> <p>*提取的 RNA 样品没有保存在 -20℃或 -70℃低温-<b>建议</b>：尽可能的将 RNA 保存在 -70℃的低温。</p> <p>*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。</p>

---