

M5 RNAPure 通用动物超纯总 RNA 快速提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 RNAPure 通用动物超纯总 RNA 快速提取试剂盒	50T	MF172-01

【储存条件】

室温储存 12个月不影响使用效果。裂解液 RL 可以常温运输，收到后 4℃避光可长期保存，常温保存 3个月也不影响使用质量。

【产品简介】

改进的异硫氰酸胍/酚一步法 (TRIzol 法) 裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后总 RNA 在高离子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。

【产品特色】

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
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。

【产品组份】

	50T	注意事项
裂解液 RL	50 ml	4 度避光保存
去蛋白液 RE	25 ml	室温密闭干燥保存
漂洗液 RW	10 ml	初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇
RNase-Free H ₂ O	10 ml	室温密闭干燥保存
RNase-Free 吸附套管	50 套	室温密闭干燥保存

【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. 本试剂盒抑制 RNA 酶效果极佳，所有离心步骤如未加说明，均可在常温进行。
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，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，如需稀释 RNA 样品应该用 TE (PH8)，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 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，第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量无水乙醇!>

1. 匀浆处理

a. 组织

将组织在液氮中磨碎，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 10cm² 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，小心弃上清。每 5~10×10⁶ 的动物细胞，植物细胞加 1ml 的 RL。在 RL 试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。在加入 RL 前应避免洗涤细胞，否则会增大 mRNA 降解的可能性。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀，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 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°C 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 1ml RL 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°C 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 50%，把水相小心转移到新管中（不要触碰中间层），记录水相体积。

6. 加入水相体积一半也就是 0.5 倍体积的无水乙醇，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，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱 RA 中，请分两次转入吸附柱 RA 中。），12,000rpm 离心 45 秒，弃废液，将吸附柱重新套回收集管。

7. 加 500μl 去蛋白液 RE，12,000 rpm 离心 45 秒，弃废液。

8. 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，弃废液。

9. 重复步骤 8 一次。

10. 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。

11. 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，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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。