

总 RNA 快速提取试剂盒(柱式)

(适用范围：细胞、组织、全血、骨髓、体液、细菌、病毒)

产品组成：

RA1	10ML (仅提取细胞浆 RNA 时使用)
RA2	30ML
Wash Buffer	9ML(第一次使用前加入 51ML 无水乙醇)
洗脱液	10ML
吸附柱 (内外管)	50 套

产品简介：

Proandy 自主研发的本品，提取时间快 (7-10min)，步骤最少 4 步 (裂解-吸附-清洗-洗脱)。

获得的 RNA 质量与 RNAzol (Trizol) 提取相同，但操作更稳定，RNA 不易丢失，不同提取批次间变异小，较少发生 DNA 和蛋白质污染。

获得的 RNA 完整性好，纯度高 (OD260/OD280=1.9-2.1)，得率高 (>90%)，产量高 (1-5ug/ml 全血，100-300ug/1x10⁷ 细胞，1-6ug/mg 组织，50-200ug/1x10⁹ 细菌) 可以满足目前所有的后续试验要求。

实用性广，可同时适用于动物组织，细胞，细菌，植物组织等的总 RNA 提取，还可直接处理血清，血浆及其他体液。非常适用于临床标本病毒 RNA 提取用于 RT-PCR 检测。生产全线除 RNase 处理及防护，所有容器及试剂除 RNase 处理。

样本量：全血 (10-1000ul)，培养细胞 (< 1x10⁷)，组织 (< 30mg)，细菌 (< 1x10⁹)，

体液 (尿液，腹水，胸水，脑脊液等) 根据具体细胞量。

柱容量：200ug total RNA，

洗脱体积：25-50ul，

用途 普通 RT-PCR，定量 RT-PCR，NASBA，表达芯片的分析，cDNA 合成，构建 cDNA 文库，RPA，Northern Blot，mRNA 筛选等。



操作前须知注意事项:

1. 试剂盒室温保存，保质期 2 年。
2. 离心速度均为 12,000rpm-14,000rpm，室温离心（有条件可 4℃离心）。以 eppendorf 5417 离心机为例，12,000rpm=13,362g，其它类型离心机转速应达到相近的 g 数。
3. **首次使用时在洗液瓶中加入 51ML 无污染的分析纯无水乙醇，用后拧紧瓶盖。**
4. 避免环境中 RNA 酶污染，操作要戴手套，所有枪头和 eppendorf 管以 DEPC 水处理，移液枪保证洁净无 RNA 酶污染。如果把试剂放在超净台（普通超净台或专用的桌面 PCR 超净台）中操作，可以有效减少 RNA 酶污染。
5. 血液抽取后应在 4 小时内提取 RNA。冻存的血液 RNA 大部分丢失，不能用于提取。如果不能尽快提取，可以先用淋巴细胞分离液分离获得细胞后（包括其它的细胞、组织），保存在 RNA 保存液中。
6. 对细胞量 2×10^6 以下，或组织 6mg 以下，按照上述标准流程操作；对更多量的细胞和组织，有以下两种方案：**a.** 提取细胞浆 RNA（操作流程 1d），可以一次处理 1×10^7 细胞、30mg 组织（甚至更大量）。由于 RNA 90%以上存在于细胞胞浆中，因而此方法可以提取获得绝大部分 RNA，除有特殊要求提取其它部位 RNA 的实验外，一般均可选用此方法；**b.** 按细胞量每 2×10^6 ，或组织每 6mg 加入 RA2 液 600 μ l。例如 1×10^7 细胞加入 RA2 液 3000 μ l，充分颠倒混匀 2min，分 5 次取 600 μ l 移入同一内套管离心；或者分取 600 μ l 同时加入 5 支内套管离心。后续提取过程按照上述标准流程操作。
7. 有时实验者发现样本中加入 RA2 液后，出现白色絮状、丝状沉淀，这是由于加入 RA2 液前没有充分振荡混匀细胞悬液或细胞量过大，将影响 RNA 的得率。
8. 样本裂解物加入内套管中离心 1min 结束后，如管中仍有液体，表明样本超量或裂解不完全导致吸附膜阻塞。处理方案是：**a.**减少样本量；**b.**加入 RA2 液后充分震荡；**c.**如已发生阻塞又不想放弃此标本，可用加样枪头划破内套管膜的表层，再重新离心 1min。
9. 尽量保证在膜中央加入洗脱液，低于 25 μ l 将不能保证吸附膜被充分浸润。
10. 洗脱液 pH<7.0 时会明显降低 RNA 的洗脱效率，而国内实验室用水大多呈偏酸性，自备洗脱液时应当注意。本试剂盒提供的洗脱液为 pH7.6。
11. 如果获得的总 RNA 出现有明显的基因组 DNA 污染，表明操作失误，如样本中液体量太多或太少（通常加入 100 μ l），或者 RA2 液量少于 500 μ l（要求加入 500-600 μ l）。
12. 提取的总 RNA 置于 4℃或冰浴中，立即用于下游实验（如 RT-PCR）；或立即置于 -80℃冰箱保存，数天内尽快使用。无论采用何种方法提取和保存的 RNA，都往往会被很快降解，因而建议避免提取 RNA 后保存。



操作流程:

1. 样本预处理

- a. **抗凝全血**: 离心管中先加入 3ml 淋巴细胞分离液, 在上层小心加上 2-3ml 抗凝全血, 1,500rpm 室温离心 15min, 吸取中间层细胞至 1.5ml eppendorf 管, 加入生理盐水 1ml, 4,000rpm 离心 2min, 倒去上清, 加入生理盐水 100 μ l, 充分振荡形成细胞悬液, 直至没有细胞团块(重要);
- b. **组织块**: 剪切成小块后放入平皿(置冰袋上预冷)中的钢网上, 加入 DEPC 处理的 PBS 或生理盐水(约 1ml/30mg 组织), 用研磨棒将组织研磨挤压过钢网, 收集过网悬液, 取 100 μ l 放入 eppendorf 管中(也可采用液氮中捣碎或冰浴中匀浆的方法);
- c. **培养细胞**: 悬浮细胞离心后留下细胞团块和适量上清(100 μ l/ 2×10^6 细胞), 充分震荡直至没有细胞团块(重要)。取 100 μ l 放入 eppendorf 管中; 贴壁细胞消化后处理同上。
- d. 采用细胞浆 RNA 提取方法时, 取上述组织研磨液或各类细胞悬液离心(2,000rpm \times 2min), 去除上清后充分振荡致细胞团松散, 加入 RA1 液(100 μ l/ 1×10^7 细胞或 30mg 组织), 充分振荡混匀 30s, 再离心 30s, 吸取 100 μ l 上清液放入新的 eppendorf 管中;
- e. **体液及其它液体性样本**: 尿液、腹水、胸水、脑积液等根据需要取 1-10ml, 离心 2min, 留下沉淀及约 100 μ l 上清, 充分震荡悬浮沉淀; 有时也可以直接取样本 100 μ l;
- f. **细菌**: 培养良好的细菌菌液 1ml, 离心后留下细菌团块及大约 100 μ l 上清, 充分震荡悬浮细菌, 直至没有细胞团块(重要)。

2. 处理好的样本中, 加入 RA2 液 500 μ l, 充分颠倒混匀 1min。

3. 将样本裂解物吸入或倒入内套管, 离心 1min。

4. 弃去外套管中液体, 内套管中加入 500 μ l 洗液, 离心 1min。再重复此过程洗一次。

5. 取出内套管, 弃去外套管中液体, 仍然套回内套管, 不加洗液, 离心 1min。

6. 将内套管移入新的 eppendorf 管中, 在膜中央加入洗脱液(或 pH>7.0 的 DEPC 处理水) 25-50 μ l, 室温静置 1min, 离心 1min, 获得总 RNA。

