

riboEXTRACT 总 RNA 提取试剂产品使用说明

RN: R11122.2

产品简介

riboEXTRACT 总 RNA 提取试剂是一款基于酸性酚-硫氰酸胍法的单相 RNA 提取分离试剂，适合于从动植物组织或细胞等样品中分离总 RNA。本产品可快速裂解细胞或组织，经氯仿萃取后形成三相体系，其中 RNA 分布于上层水相，DNA 和蛋白分布于中间层和下层有机相，从而实现了 RNA 的分离提取。本产品在裂解样品过程中可有效快速的抑制 RNA 酶活性而获得高完整性的 RNA，经醇沉淀和洗涤及再溶解，最终获得高质量的 RNA，可用于 cDNA 合成及 RT-PCR、RT-qPCR、Northern blot、Dot blot、Primer extension、PolyA RNA 筛选以及体外翻译等分子生物学试验。

产品规格

表 1 产品规格

试剂货号	规格
C11071-1	50 mL

产品贮存条件

产品为常温运输。收到产品后，请于 2-8°C 避光保存，可以稳定保存一年。

使用前须知

- 1) 所有操作请严格遵循 RNA 操作要求。
- 2) 本产品试剂有腐蚀性，务必小心细致操作，使用过程务必佩戴一次性手套等防护用品。
- 3) 本产品试剂有挥发性气味，应在通风橱等设备中进行使用操作。
- 4) RNA 提取过程勤换手套，以减少 RNA 酶对 RNA 提取的负面影响。
- 5) 用于 RNA 提取的样品，在取样时应使用无 RNA 酶的器材处理并保存于合适条件，以避免样品中的 RNA 被降解。
- 6) 本试剂盒仅供科研使用，不可用于体外诊断或治疗。

实验材料准备

- 1) DEPC 处理水或其它无 RNA 酶水
- 2) 氯仿
- 3) 异丙醇或无水乙醇
- 4) 75%乙醇 (DEPC 处理水或其它无 RNA 酶水配制)
- 5) 无 RNA 酶的提取耗材或 DEPC 处理的提取耗材 (移液器枪头和离心管)
- 6) 高速冷冻离心机
- 7) 组织研磨工具 (用于动植物组织 RNA 提取，需 RNA 酶灭活处理)

实验用量参考

表 2 样品用量及试剂用量参考

类型	样品用量	提取试剂用量	RNA产量
动物组织	20~30 mg	1 mL	5~100 μg
植物组织	80~120 mg	1 mL	10~50 μg
细胞	1~2 $\times 10^6$ 细胞	1 mL	10~50 μg

备注：1，不同类型的样品提取获得的 RNA 量不同，部分类型样品最终获得的 RNA 量可能不在上表 RNA 产量范围内；2，贴壁细胞可按 1 个 6 孔板的培养孔对应 1 mL 提取试剂计算。

实验方法

1. 样本破碎、细胞裂解

样本类型	裂解处理
动物组织	取新鲜动物组织并用洁净无 RNA 酶剪刀剪成小块，用液氮快速将组织样品冷冻并研磨成粉末状，使用电子天平称取 25 mg 的组织于无 RNA 酶离心管内，按实验方案加入 1 mL 的提取试剂，剧烈振荡以裂解样品，混匀后室温放置 3 分钟，4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 5 分钟，将上清转移到新的 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中。
植物组织	取新鲜叶片组织，用液氮将植物样品冷冻并研磨成粉末状，称取 100 mg 组织至无 RNA 酶离心管中，立即按实验方案加入 1 mL 的提取试剂，剧烈振荡以裂解样品，混匀后室温放置 3 分钟，4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 5 分钟，将上清转移到新 1.5 mL 新的 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中。
悬浮细胞	取 2 $\times 10^6$ 的细胞转移至 1.5 mL 无 RNA 酶离心管，离心收集细胞，用移液器吸弃培养基，PBS 润洗一至两次，振荡或其它方式使细胞沉淀分散，加入 1 mL 的提取试剂，剧烈振荡以裂解样品，混匀后室温放置 3 分钟。
贴壁细胞	方式一：消化细胞后按悬浮细胞的方法操作； 方式二：移液器吸弃培养基，PBS 润洗一至两次，彻底吸弃 PBS，1 个 6 孔板的培养孔加入 1 mL 提取试剂，移液器反复吹打使细胞完全裂解，收集裂解液于 1.5 mL 无 RNA 酶离心管。

备注：1，组织或细胞样本在提取试剂中充分匀浆或裂解后，可在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件保存半年；2，贴壁细胞裂解时注意孔底各个角落均应吹充分吹打。

2. RNA 分离

步骤	操作及现象
1	在样品管内加入 200 μL 的氯仿，剧烈振荡，使氯仿与裂解液完全混匀。
2	室温静置 5 分钟。
3	4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 15 分钟。离心后样品分为三层，分别为上层透明的水相，中间往往呈白色的中间层以及下层红色的有机相。
4	小心转移上层水相至新的 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中，加入等体积的异丙醇，充分颠倒混匀。为获得高纯度的 RNA，转移上层水相时尽量不扰动不吸取到中间层或下层有机相。
5	室温静置 10 分钟。

6	4°C 12000 g 离心 15 分钟。离心后可见白色 RNA 沉淀，沉淀大小跟样品 RNA 量有关。
7	倒弃上清液，吸弃残留液体，加入 1 mL 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀，上下颠倒使 RNA 沉淀漂浮，4°C 12000 g 离心 5 分钟，弃掉上清。可重复洗涤一次。若 RNA 沉淀不明显则宜全程采用吸弃的方法去除上清液。 注：此步骤不宜剧烈振荡。
8	4°C 12000 g 短暂离心 2 分钟，用移液器尽量吸弃溶液，开盖室温晾干至 RNA 沉淀边缘变透明（若干分钟），向 RNA 沉淀中加入适量的无 RNA 酶水进行溶解。 注：不宜晾干过度，完全干燥的 RNA 较难溶解。

3. 下游分析

检测方法	检测意义	操作步骤及分析标准
吸光度检测	RNA 浓度及纯度	用紫外分光光度计检测 RNA 浓度及 A260/A280 和 A260/A230 比值，RNA 浓度(ng/ μ L)= A260 \times 40 \times 稀释倍数，A260/A280=1.8-2.1. A260/A230 \geq 1.8。
电泳分析	RNA 完整性	取 0.5-1 μ g RNA 样品于 1.0%琼脂糖凝胶，5 V/cm 电泳 15-30 分钟。比较理想的 RNA 样本能够检测到完整清晰的 28S、18S 等核糖体 RNA 条带。

备注：1，RNA 浓度对 A260/A230 的结果影响很大，对于低浓度样品，无有效参考依据。2，亦可使用其它 RNA 浓度检测方法 & 完整性检测方法。

相关产品

表 3 相关产品

产品编号	产品名称
C11027-2	riboSCRIPT Reverse Transcription Kit (100T)
C00110-1	Random Primer (200uM, 20uL)
C00111-1	Oligo (dT)18 Primer (25uM, 20uL)
C11030-1	riboSCRIPT mRNA/lncRNA qRT-PCR Starter Kit (20T RT + 60T qPCR)
Variant ^a	gen/lnc/circDETECT RNA_qPCR_Primer
C10211-1	Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Starter Kit (20T RT + 60T qPCR)
C10211-2	Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Starter Kit (100T RT + 300T qPCR)
Variant ^a	Bulge-Loop miRNA Primer Set
C10712-1	miDETECT A Track miRNA qRT-PCR Starter Kit(20T ployA+20T RT+200T qPCR)
Variant ^a	miDETECT A Track miRNA Forward Primer
C00109 ^b	ROX Reference Dye

注：a. 根据基因及引物不同产品编号不同； b. 有多个的规格。

FAQ

1. 提取不同动物组织 RNA 时，RNA 的产量如何？

小鼠组织类型 (25 mg)	RNA产量
肝组织	100~150 μg
肾组织	20~50 μg
脑组织	20~50 μg
脾脏组织	20~50 μg
肌肉组织	5~10 μg

2. 提取的 RNA 产量低、RNA 降解或提取 RNA 质量差、杂质多的原因？

- 1) RNA 提取准备工作没做好，实验环境中存在 RNA 酶污染，或者实验过程产生 RNA 酶污染；
- 2) 提取的组织或细胞过多导致不能充分被提取液裂解；
- 3) 氯仿抽提结束后吸取上清时不小心吸取到了中间层或下层有机相；
- 4) 组织中富含多酚、多糖类成分影响 RNA 的提取效果；
- 5) 样本贮存条件不合适导致 RNA 降解。

3. 提取的 RNA A260/A280 数值不理想的原因？

- 1) A260/A280 偏小的原因可能是 RNA 提取试剂用量与样品用量关系不对导致裂解不够充分；加入氯仿时剧烈振荡不充分；吸取上清时不小心吸取到了中间层或下层有机相；氯仿过量加入或有酚的残留；
- 2) A260/A280 > 2.1 的原因可能是 RNA 降解导致的增色效应；
- 3) 吸光度检测仪器未有效校正也容易导致数值异常。

4. riboEXTRACT 总 RNA 提取试剂是否可用于小 RNA 提取？

riboEXTRACT 总 RNA 提取试剂可以分离提取组织或细胞的总 RNA，也包括小 RNA。