

组织（细胞）RNA 提取试剂盒（柱式法）使用说明书

【预期用途】

组织（细胞）RNA 提取试剂盒（柱式法）用于从各种动物组织（虾、鱼、蟹等水生动物组织除外）、培养细胞以及各种体液或拭子细胞中分离纯化 RNA。

【检验原理】

破坏组织，释放细胞。裂解液裂解细胞释放核酸，并保护 RNA 不被核酸酶水解。细胞中和液清除 DNA，硅胶膜高效吸附 RNA，洗涤吸附柱，去除蛋白、盐等杂质。在洗脱液作用下，硅胶膜释放吸附的 RNA，从而获得高质量的 RNA。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	组成成分	50T	100T	200T
MDT-TCR01N-1	细胞裂解液 N	25mL×1 瓶	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶
	中和缓冲液 M	7.5mL×1 瓶	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶
	RAW1 缓冲液	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	48mL×1 瓶
	吸附柱（含收集管）	50 支	100 支	200 支
	洗脱液 A	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶
	使用说明书	1 份	1 份	1 份

所有试剂：常温（10-30℃）运输保存。有效期 1 年。

【注意事项】使用前务必认真阅读以下注意事项

- 1. 提前配制 RAW1，RAW1 中乙醇含量低于 60%会影响提取效率。
- 2. 提前配制 80%乙醇水溶液，乙醇水溶液中乙醇含量低于 80%会影响提取效率。
- 3. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
- 4. 虽然本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但细胞裂解液 N、中和缓冲液 M 和 RAW1 缓冲液中含刺激性化合物，操作时最好做好必要的防护措施，戴口罩手套，并且在通风的生物安全柜中进行。
- 5. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

新鲜、液氮中保存或组织保存液中保存的组织或细胞；新鲜的尿液、脓液、胸腹水、肺泡灌洗液、脑脊液、组织渗出液、组织浸出液等体液以及各种拭子样本。

【适用范围】

≤5.0×10⁶个细胞；≤20mg 动物组织。

【样本用量及 RNA 得率】

表 1 样本用量及 RNA 得率

样本类型	样本用量	RNA 得率 (μg)
上皮细胞	5.0×10 ⁶ 个	60-80
肝组织	≤5mg	20-70
肾组织	≤5mg	20-60
胃组织	≤5mg	10-38
脾组织	≤5mg	5-20
心肌	≤10mg	5-20
肠组织	≤10mg	15-40
脂肪组织	≤20mg	5-10

【自备器械和试剂】

小型高速离心机（最大离心力≥12,000×g）、高速匀浆器（研钵、液氮）、2mL 离心管、PBS、生理盐水、无水乙醇和异丙醇等。

- **RAW1 配制：**RAW1 缓冲液使用前按照瓶身标签说明加入相应量的无水乙醇，使乙醇含量为 60%，混匀后密封常温保存。
- **80%乙醇水溶液配制：**1 份水加入 4 份无水乙醇，配制成 80%乙醇水溶液，混匀后密封常温保存。

【样本的处理】

一、细胞样本的处理

1. 胰酶消化后的贴壁生长细胞

1.1 在指数生长期，取适量胰酶消化后培养液重悬的细胞加入 1.5mL 离心管中，12,000×g 离心 1 分钟，弃上清，保留细胞沉淀。

1.2 在细胞沉淀中加入 400μL 细胞裂解液 N，充分吹打使细胞沉淀完全消失。

2. 贴壁生长细胞

2.1 在指数生长期，弃去 6 孔培养板（T-25 培养瓶或 35mm 培养皿）中培养液，保留贴壁生长的细胞。用 PBS 润洗 1 遍，弃去 PBS；在培养板（瓶/皿）加入 500μL 细胞裂解液 N，轻轻晃动培养板（瓶/皿），使培养板（瓶/皿）底部被裂解液完全经过。轻轻吹打细胞裂解液 N，确保全部细胞被裂解。

►尽量弃去培养液和 PBS。

►本试剂最大能直接处理 6 孔培养板（T-25 培养瓶或 35mm 培养皿）中生长的贴壁细胞。

►吹打细胞裂解液 N 处理培养板（瓶/皿）时，动作要轻，避免产生大量泡沫。

2.2 吸取 400 μ L 培养板（瓶/皿）中的裂解后的细胞裂解液 N 至一个新的 1.5mL 离心管中。

3. 液体培养细胞

3.1 在 1.5mL 离心管中加入适量处于指数生长期的培养细胞的悬液（或者已计数的细胞悬液），12,000 $\times$ g 离心 1 分钟，弃上清，保留细胞沉淀。

3.2 在细胞沉淀中加入 400 μ L 细胞裂解液 N，充分吹打使细胞沉淀完全消失。

4. 细胞保存液保存的细胞

4.1 取出细胞保存液保存的细胞，37 $^{\circ}$ C 水浴中摇动至完全融化。取适量细胞转入 1.5mL 离心管中，12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。弃上清，保留细胞沉淀。

4.2 在细胞沉淀中加入 400 μ L 细胞裂解液 N，充分吹打使细胞沉淀完全消失。

二、体液（拭子）样本的处理

1.1 体液样本：取一定量的新鲜体液样本加入 1.5mL 离心管中，12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。吸弃上清，保留细胞沉淀。

1.2 各种拭子（宫颈刷）样本：将拭子（宫颈刷）在生理盐水中振荡 20 秒。取 1mL 振荡后的生理盐水加入至 1.5mL 离心管中，12,000 $\times$ g 离心 1 分钟，弃上清，保留细胞沉淀。

2. 在细胞沉淀中加入 200 μ L 生理盐水，充分悬浮细胞。12,000 $\times$ g 再次离心 1 分钟。吸弃上清，保留细胞沉淀。

3. 在细胞沉淀中加入 400 μ L 细胞裂解液 N，吹打混匀至细胞沉淀完全消失。

三、动物组织的处理

按下表说明使用动物组织的量

高丰度 RNA 的组织（如肝、肾、胃）	≤5mg
中丰度 RNA 的组织（如脑、肺、卵巢、胸腺、脾、心脏肌肉等）	≤10mg
低丰度 RNA 的组织（膀胱、骨、脂肪）	≤20mg

1. 液氮研磨法

1.1 取≤20mg 的组织，转移至预冷的研钵中，加液氮磨成粉末。

1.2 将组织粉末转移至 1.5mL 离心管中，将液氮充分挥发。

1.3 加入 450μL 细胞裂解液 N，吹打混匀。室温静置 2 分钟。

1.4 吸取 400μL 上清转入至 1.5mL 离心管中。

►液氮挥发和研磨必须充分，否则将影响 RNA 的提取效率。

2. 高速匀浆法

2.1 用镊子取出组织保存液（MDT-TP01）保存的组织（冷冻的保存液需 37℃振荡孵育至保存液完全融化），转入 1.5mL 离心管中。

2.2 加入 1mL75%乙醇漂洗 1 次，取出组织块用吸水纸将乙醇吸干。尽量剪碎组织，称取≤20mg 的组织，转入 2mL 平底离心管。

►组织需尽量剪碎。

2.3 在 2mL 平底离心管中加入 450μL 细胞裂解液 N，用高速匀浆器充分匀浆。

2.4 吸取 400μL 匀浆液至 1.5mL 离心管中。

►组织保存液保存的组织需用 75%乙醇漂洗 1 次，用吸水纸将乙醇吸干后用剪刀尽量剪碎再进行匀浆。

►匀浆必须充分，否则将影响 RNA 的提取效率。

►对一些难以匀浆的组织（如结缔组织、肌肉组织）匀浆后 12,000×g 离心 1 分钟，再吸取 400μL 匀浆液继续操作会获得更好的提取效果。

【快速操作流程】



1. 准备工作

- ☑ 检查RAW1是否配制。
- ☑ 检查80%乙醇水溶液是否配制。

2. 在含处理后样本的1.5mL离心管中加入150μL中和缓冲液M，吹打混匀。

3. 闭盖12,000×g离心5分钟。

4. 吸取所有上清至1.5mL离心管中，**细胞样本加入250μL异丙醇/组织样本加入150μL 异丙醇**，吹打混匀。转移所有液体至吸附柱。

5. 闭盖12,000×g离心1分钟。弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。

6. 加入600μL RAW1，闭盖12,000×g离心20秒。弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。

7. 加入600μL 80%乙醇水溶液，闭盖12,000×g离心20秒。弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。

8. 加入600μL 80%乙醇水溶液，闭盖12,000×g离心20秒。取出吸附柱，丢弃收集管。

9. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，闭盖12,000×g离心3分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。

10. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，加入50μL洗脱液A至吸附柱中心位置。闭盖室温静置1分钟，12,000×g离心1分钟，收集洗脱液。

【标准操作步骤】

1. 在上述含处理后样本的离心管中加入 150 μ L 中和缓冲液 M，充分混匀。

2. 闭盖 12,000 $\times$ g 离心 5 分钟。

3. 吸取所有上清至 1.5mL 离心管中，细胞样本加入 250 μ L 异丙醇/组织样本加入 150 μ L 异丙醇，吹打混匀。将吸附柱放入收集管中，转移所有液体至吸附柱。

➤ 尽量避免吸入有些组织（比如肝脏）离心后产生的膜样物质。

➤ 尽量避免吸出沉淀。

➤ 细胞样本用 250 μ L 无水乙醇替代 250 μ L 异丙醇也可以获得满意的提取效果。

➤ 组织样本用 200 μ L 无水乙醇替代 150 μ L 异丙醇也可以获得满意的提取效果。

4. 闭盖 12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。取出吸附柱，弃去废液，将吸附柱重新放入收集管中。

5. 开盖，在吸附柱中加入 600 μ L RAW1，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去废液，将吸附柱重新放入收集管中。

➤ 对于过柱后膜上出现红色的样本，加入 RAW1 后闭盖静置 30 秒，以充分溶解红色物质。

➤ 加入 RAW1 时，避免 RAW1 接触吸附柱的管口。

6. 开盖，在吸附柱中加入 600 μ L 80%乙醇水溶液，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去废液，将吸附柱重新放入收集管中。

7. 开盖，在吸附柱中加入 600 μ L 80%乙醇水溶液，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 20 秒。取出吸附柱，丢弃收集管。

8. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 3 分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。

9. 将吸附柱转入新的 1.5mL 离心管中，开盖，加入 50 μ L 洗脱液 A 至吸附柱中心。闭盖室温静置 1 分钟，12,000 $\times$ g 离心 1 分钟，收集洗脱液，备用。

➤ 洗脱液 A 的使用量可以根据需要调整，但用量不得低于 30 μ L。

➤ 洗脱液 A 的使用量太少会影响提取效果。

【组织（细胞）RNA 提取（柱式法）常见问题】

常见问题	原因	解决方案
吸附柱堵塞	1.样本使用量过多	减少样本使用量，动物组织不超过 20mg，细胞不超过 5×10^6 个。
	2.样品富含肌纤维	肌肉、心脏以及皮肤等富含肌纤维的样本建议采用液氮研磨方式处理，并增加研磨时间和力度
	3.组织研磨或匀浆不充分	对于有些样本比如肌肉样本等，研磨或匀浆后先用 $12,000 \times g$ 离心裂解样本 1 分钟，再取上清进行后续提取。
未提取到 RNA 或产量低	1.样本使用量过少	增加样本使用量，但动物组织不超过 20mg，细胞不超过 5×10^6 个。
	2.样本未及时保存或保存不当	样本保存温度不当或保存时间过长，内源性 RNase 导致 RNA 降解。采用新鲜、液氮保存或保存液保存的样本
	3.组织研磨或匀浆不充分	增加研磨或匀浆时间和力度。
	4.裂解液和中和缓冲液使用不当	按说明书正确加入裂解液和中和缓冲液。
	5.取上清过程中吸出沉淀或膜样物质	尽量避免吸入沉淀和有些组织（比如肝脏）离心后产生的膜样物质。
	6.异丙醇使用量过少或过多	按说明书准确加入异丙醇。
	7. RAW1 中乙醇添加比例不当	使用无水乙醇配制 RAW1，使乙醇含量达 60%。
	8. 80%乙醇水溶液配制不当	使用无水乙醇配制 80%乙醇水溶液，乙醇含量达 80%。
	9.洗脱不当	洗脱液加至膜中央，适当减少洗脱体积，可 65°C 预热洗脱液、延长室温静置时间或者进行二次洗脱。

RNA 降解	1.样本未及时保存或保存不当	采用新鲜、液氮保存或组织保存液（RNA Later）保存的样本。
	2.样本反复冻融	避免样本反复冻融，分装保存。
	3.电泳污染和环境污染	电泳前确保电泳槽、制胶板和电泳液无 RNase 污染，如有污染：①使用洗洁精充分清洗电泳槽和制胶板，再用 3%双氧水浸泡 20 分钟，然后用 RNase-free ddH ₂ O 进行冲洗；②或使用本公司的核酸酶清除剂（MDT-NSS）清除 RNase；使用 RNase-free ddH ₂ O 配制电泳缓冲液。
纯度低	1.盐离子残留	加入 RAW1 后闭盖静置 30 秒；避免 RAW1 接触吸附柱上下口；使用 80%乙醇水溶液再洗涤 1 次。
	2.蛋白残留	有些样本蛋白含量较高，容易导致蛋白残留。减少样本使用量；加入 RAW1 后闭盖静置 30 秒；增加 1 次 RAW1 洗涤。
	3.乙醇残留	最后一次洗涤后，吸附柱闭盖 12,000×g 再离心 3 分钟。
gDNA 污染	1.样本使用量过高	不同样本中 DNA 含量相差大，减少样本使用量，动物组织不超过 20mg，细胞不超过 5×10 ⁶ 个。
	2.裂解液和中和缓冲液使用不当	按说明书正确加入裂解液和中和缓冲液。

【说明书编制日期】 2025 年 01 月 25 日

【基本信息】

企业名称：无锡迈德泰克生物医药有限公司

公司地址：江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道 1699 号生命科技产业园 C5 楼 C50206 室

网 址：www.wuxi-medtech.com

联系电话：173 1562 0564（微信同号）；138 6175 7779（微信同号）