

细胞（细菌）RNA 提取试剂盒（柱式法）使用说明书

【预期用途】

细胞(细菌)RNA 提取试剂盒(柱式法)用于从培养细胞或革兰氏阴性细菌中分离纯化总 RNA。

【检验原理】

裂解液裂解细胞释放核酸，并与核酸保护剂一起保护 RNA 不被核酸酶水解。中和缓冲液清除 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-CBR01N	细胞裂解液 C	20mL×1 瓶	40mL×1 瓶	80mL×1 瓶
	核酸保护剂	1mL×1 支	2mL×1 支	4mL×1 瓶
	中和缓冲液 R	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

核酸保护剂：常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

其他成分：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. 使用前检查细胞裂解液 C 是否出现混浊，如有混浊，可于 37℃以上孵育至澄清。
2. 使用前检查中和缓冲液 R 是否出现混浊或结晶，如有混浊或结晶，可于 37℃以上孵育至澄清。
3. 提前配制 RAW1，RAW1 中乙醇含量低于 60%会影响提取效率。
4. 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。
5. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
6. 本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但细胞裂解液 C 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。
7. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

新鲜的细胞标本、革兰氏阴性细菌标本、细胞保存液长期保存的细胞

【适用范围】

≤5.0×10⁶ 个细胞；≤2.0×10⁹ 个革兰氏阴性细菌。

【样本用量及 RNA 得率】

细胞数（个）	RNA 得率（μg）
1mL 对数生长期大肠杆菌	25-30
5.0×10 ⁴ 上皮细胞	0.5-1
1.0×10 ⁵ 上皮细胞	1.5-2.0
1.0×10 ⁶ 上皮细胞	15-20
5.0×10 ⁶ 上皮细胞	60-80

【自备器械和试剂】

小型高速离心机（最大离心力 $\geq 12,000\times g$ ）、高速匀浆器（研钵、液氮）、1.5mL 离心管、生理盐水、PBS、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。
- 每次使用前检查**细胞裂解液 C**和**中和缓冲液 R**是否出现沉淀或结晶，如有沉淀或结晶，请于 37°C 以上孵育至液体澄清（孵育需要 5-10 分钟）。

【样本处理】

1. 胰酶消化后的贴壁生长细胞

1.1 在指数生长期，取适量胰酶消化后的细胞加入 1.5mL 离心管中， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留细胞沉淀。

1.2 在细胞沉淀中加入 20 μ L 核酸保护剂和 400 μ L 细胞裂解液 C，充分吹打使细胞沉淀完全消失，室温静置 2 分钟。

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 20 μ L 核酸保护剂和 500 μ L 细胞裂解液 C，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 C，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 C 处理培养板（瓶/皿）时，动作要轻，避免产生大量泡沫。

2.2 转移 400 μ L 培养板（瓶/皿）中的细胞裂解液 C 至一个新的 1.5mL 离心管中。

3. 液体培养的细胞（革兰氏阴性细菌）

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（革兰氏阴性细菌）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（细菌）沉淀。

3.2 在细胞（细菌）沉淀中加入 20 μ L 核酸保护剂和 400 μ L 细胞裂解液 C，充分吹打使细胞（细菌）完全消失，室温静置 2 分钟。

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°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 20 μ L 核酸保护剂和 400 μ L 细胞裂解液 C，充分吹打使细胞沉淀完全消失，室温静置 2 分钟。

5. 固体培养的革兰氏阴性细菌

5.1 用接种环刮取一定量的革兰氏阴性细菌，加入 1mL 生理盐水中，充分混匀后， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留细菌沉淀。

5.2 在细菌沉淀中加入 20 μ L 核酸保护剂和 400 μ L 细胞裂解液 C，充分吹打使细菌沉淀完全消失，室温静置 2 分钟。

【操作步骤】

1. 在上述含已处理细胞（细菌）的 1.5mL 离心管中加入 150 μ L 的中和缓冲液 R，吹打混匀。

➤加入中和缓冲液 R 后务必充分混匀。

2. 闭盖 $12,000\times g$ 离心 5 分钟。

3. 吸取 500 μ L 上清至 1.5mL 离心管中，加入 250 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。

➤吸取上清时，尽量避免吸出沉淀。

➤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。

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。

➤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。将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中。

8. 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，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。

【细胞（细菌）RNA 提取（柱式法）常见问题】

常见问题	原因	解决方案
未提取到 RNA 或产量低	1. 样本使用量过少	增加样本使用量, 但细胞不超过 5×10^6 个, 革兰氏阴性细菌不超过 2.0×10^9 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. 细胞裂解液和中和缓冲液使用不当	细菌裂解液和中和缓冲液在温度较低时可能出现浑浊或结晶, 使用前应置于 37°C 以上孵育直至完全溶解; 按说明书正确加入细胞裂解液和中和缓冲液。
	4. 异丙醇使用量过少或过多	按说明书准确加入异丙醇。
	5. 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%。
	6. 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%。
	7. 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、延长室温放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、液氮保存或保存液保存的样本。
	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 min, 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. 乙醇残留	最后一次洗涤后, 吸附柱闭盖 $12,000 \times g$ 再离心 3 分钟。
gDNA 污染	1. 样本使用量过高	减少样本使用量, 细胞不超过 5×10^6 个, 革兰氏阴性细菌不超过 2.0×10^9 个。
	2. 细胞裂解液 C 和中和缓冲液 R 加入时操作不当	细胞裂解液 C 和中和缓冲液 R 加入后务必充分吹打混匀。

【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)