

# 动物组织 RNA 提取试剂盒（磁珠法）使用说明书

## 【预期用途】

动物组织 RNA 提取试剂盒（磁珠法）用于从各种动物组织（虾、鱼、蟹等水生动物肌肉组织除外）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，RNA 被硅胶磁珠高效吸附，洗涤磁珠，去除蛋白、盐等杂质。在洗脱液低盐高 pH 值的情况下，磁珠释放吸附的 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-ATR02N	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
	磁珠	0.5mL×1 支	1mL×1 支	2mL×1 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

**磁珠：**常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

**其他试剂：**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%会影响提取效果。
2. 提前配制 80%乙醇水溶液，乙醇水溶液中乙醇含量低于 80%会影响提取效果。
3. 磁珠使用前必须混匀。
4. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
5. 虽然本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但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。
6. 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动物组织。

## 【适用范围】

≤20mg 动物组织。

## 【样本用量及 RNA 得率】

样本类型	样本用量 (mg)	RNA 得率 (µg)
肝组织	≤10	20-70
肾组织	≤10	20-60
脾组织	≤10	5-20
心肌	≤10	5-20
肠组织	≤10	15-40
胃组织	≤10	10-38
脂肪组织	≤20	5-10

## 【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、磁力架、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】

### 按下表说明使用动物组织的量

高丰度 RNA 的组织（如肝、肾、胃）	$\leq 10\text{mg}$
中丰度 RNA 的组织（如脑、肺、卵巢、胸腺、脾、心脏肌肉等）	$\leq 15\text{mg}$
低丰度 RNA 的组织（膀胱、骨、脂肪）	$\leq 20\text{mg}$

### 1. 液氮研磨法

1.1 取 $\leq 20\text{mg}$  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 450 $\mu\text{L}$  细胞裂解液 N，吹打混匀，静置 2 分钟。12,000 $\times g$  离心 1 分钟。

1.4 吸取 400 $\mu\text{L}$  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 在 2mL 平底离心管中加入 450 $\mu\text{L}$  细胞裂解液 N 和 $\leq 20\text{mg}$  切碎的组织（组织保存液保存），用高速匀浆器充分匀浆。

2.2 吸取 400 $\mu\text{L}$  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 $\times g$  离心 1 分钟，再吸取 400 $\mu\text{L}$  匀浆液继续操作会获得更好的提取效果。

## 【操作步骤】

1. 在含上述处理后样本离心管中加入 150 $\mu\text{L}$  中和缓冲液 M，充分吹打混匀。

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，加入 250 $\mu\text{L}$  异丙醇和 10 $\mu\text{L}$  磁珠，3,000rpm 振荡混匀 30 秒。

▶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。

▶磁珠使用前必须充分混匀。

4. 取出离心管，瞬时离心。将离心管放于磁力架上，吸附磁珠至液体清澈。开盖，吸弃液体，保留磁珠。

▶吸附磁珠务必至液体清澈。

5. 加入 600 $\mu$ L RAW1，闭盖。从磁力架上取下离心管，充分混匀使磁珠完全分散至洗液中。

6. 将离心管放回磁力架，吸附磁珠至液体清澈（**吸附过程中颠倒磁力架数次，使离心管盖上残留的磁珠被充分回收**）。开盖，吸弃液体，保留磁珠（需吸干管底和管盖中的残留液体）。

▶吸附磁珠务必至液体清澈。

7. 加入 600 $\mu$ L 80%乙醇水溶液。从磁力架上取下离心管，充分混匀使磁珠完全分散至洗液中。

8. 将离心管放回磁力架，吸附磁珠至液体清澈（**吸附过程中颠倒磁力架数次，使离心管盖上残留的磁珠被充分回收**）。开盖，吸弃液体，保留磁珠（需吸干管底和管盖中的残留液体）。

▶吸附磁珠务必至液体清澈。

9. 加入 600 $\mu$ L 80%乙醇水溶液。从磁力架上取下离心管，用移液器吹打混匀，使磁珠完全分散在 80%乙醇中。转移 80%乙醇中的磁珠至新的 1.5mL 离心管中。

▶必须将 80%乙醇中的磁珠转移至新的 1.5mL 离心管中，否则在测定 RNA 浓度时易引起 230 异常。

10. 将新的离心管放回磁力架，吸附磁珠至液体清澈。开盖，吸弃液体，保留磁珠。

▶吸附磁珠务必至液体清澈。

11. 将离心管放入离心机，闭盖瞬时离心 5 秒。

12. 将离心管放回 2mL 磁力架，开盖，吸弃残留液体。

13. 将离心管放入金属浴，开盖，50 $^{\circ}$ C 烘干 2 分钟。闭盖，取出离心管。

▶样本较多时，取出离心管后必须闭盖，以防磁珠过度干燥，影响洗脱效果。

14. 开盖，在离心管中加入 100 $\mu$ L 洗脱液 A，充分吹打混匀磁珠。闭盖，室温 1,500rpm 振荡 1 分钟。

▶洗脱液 A 的量可以根据需要调整。

15. 将离心管放入磁力架上，吸附磁珠 2 分钟至液体清澈。开盖，吸取洗脱液转移至新的离心管中。

▶为了避免洗脱液中微量磁珠残留，洗脱液转移至新的离心管后，可以 12,000 $\times$ g 离心 1 分钟，以彻底去除磁珠。

## 【动物组织 RNA 提取（磁珠法）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，但动物组织使用量不超过 20 mg。
	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、液氮保存或组织保存液（RNA Later）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%。
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，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 <sub>2</sub> O 进行冲洗，使用 RNase-free ddH <sub>2</sub> 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	延长烘干时间。
gDNA 污染	1. 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】 2024 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](http://www.wuxi-medtech.com)

联系电话：173 1562 0564（微信同号）；

138 6175 7779（微信同号）