组织（细胞）RNA 提取试剂盒（Trizol-沉淀法）使用说明书

【预期用途】
组织（细胞）RNA 提取试剂盒（Trizol-沉淀法）用于从组织、培养细胞、革兰氏阴性细菌以及各种体液或拭子细胞中分离纯化总 RNA。

【检验原理】
核酸提取缓冲液使蛋白质和 RNase 变性，促使 RNA 与蛋白质分离的同时保护 RNA 不被降解。在酸性条件下，RNA 保留在上层水相中。吸取上层水相，加入乙醇沉淀 RNA，沉淀的 RNA 洗涤后去除蛋白等污染物，RNA 干燥后用水溶解，从而达到纯化 RNA 的目的。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	组成成分	50T	100T	200T
MDT-TCR01-TC	核酸提取缓冲液	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	100mL×2 瓶
	使用说明书	1 份	1 份	1 份

核酸提取缓冲液：常温（10-30℃）运输，阴凉避光保存。有效期 1 年。

【注意事项】<u>**使用前务必认真阅读以下注意事项**</u>
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. 本产品配制和操作过程中涉及苯酚和氯仿等 OSHA 规定的危险物品，操作时必须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。
4. 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、细胞以及革兰氏阴性细菌；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】
≦5.0×10^6个细胞；≦2.0×10^9个革兰氏阴性细菌；≦20mg 动物组织；≦100mg 植物组织。

【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）、1.5mL 和 2mL 离心管、生理盐水、DEPC 水或 TE（pH8.5）、PBS、氯仿和无水乙醇等。

【样本处理】
一、动物组织的处理
按下表说明使用组织的量

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

1. 液氮研磨法

1.1 取≦20mg 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 1mL 核酸提取缓冲液，吹打混匀。

1.4 室温（25℃）放置 5 分钟。

1.5 将离心管放入离心机，5,000rpm 离心 10 秒，尽量吸取上清转入至 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≦20mg 切碎的组织（**组织保存液保存**）和 1mL 核酸提取缓冲液，使用匀浆器充分匀浆。

➤**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。**
➤**组织一旦放入核酸提取缓冲液中，匀浆一定要迅速进行。**
➤**为确保 RNA 的提取效率，组织匀浆必须充分。**
➤**匀浆过程中如产生泡沫，5,000rpm 离心 10 秒可以消除泡沫和组织残渣。**

2.2 室温（25℃）放置 5 分钟。

2.3 将离心管放入离心机， 5,000rpm 离心 10 秒，尽量吸取上清转入至 1.5mL 离心管中。

二、植物组织的处理

按下表说明使用组织的量

植物种子、嫩芽和嫩叶	10-30mg
植物纤维组织	30-100mg

1. 液氮研磨法

1.1 取≦100mg 细碎的植物组织，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 1mL 核酸提取缓冲液，吹打混匀。

1.4 室温（25℃）放置 5 分钟。

1.5 将离心管放入离心机，5,000rpm 离心 10 秒，尽量吸取上清转入至 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≤100mg 搅碎（切碎）的组织和 1mL 核酸提取缓冲液，使用匀浆器充分匀浆。

➢高速匀浆法处理植物组织时，植物组织使用前应尽量搅碎（切碎），果肉、果皮等组织推荐使用液氮研磨法进行处理。
➢为确保 RNA 的提取效率，组织匀浆必须充分。
➢匀浆过程中如产生泡沫，5,000rpm 离心 10 秒可以消除泡沫和组织残渣。

2.2 室温（25℃）放置 5 分钟。

2.3 将离心管放入离心机，5,000rpm 离心 10 秒，尽量吸取上清转入至 1.5mL 离心管中。

三、细胞样本的处理

1. 胰酶消化后的贴壁生长细胞：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×g 离心 1 分钟，弃上清，保留细胞沉淀。

2. 液体培养细胞（革兰氏阴性细菌）：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×g 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

3. 细胞保存液保存的细胞：取出细胞保存液保存的细胞，37℃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×g 离心 1 分钟。弃上清，保留细胞沉淀。

4.固体培养的革兰氏阴性细菌：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×g 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

5. 在上述沉淀（细胞样本的处理中的**"步骤 1-4"**）中加入 1mL 核酸提取缓冲液，吹打混匀至细胞沉淀完全消失。

6.贴壁生长细胞：
6.1 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 1mL 核酸提取缓冲液，轻轻晃动培养板（瓶/皿），使培养板（瓶/皿）底部被核酸提取缓冲液完全经过。轻轻吹打"核酸提取缓冲液"，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。

6.2.转移培养板（瓶/皿）中所有"核酸提取缓冲液"至一个新的 1.5mL 离心管中。

7. 将含已处理样本的"核酸提取缓冲液"室温（25℃）放置 5 分钟。

四、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×g 离心 1 分钟。吸弃上清，保留沉淀。

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×g 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

2. 在沉淀中加入 500μL 生理盐水，充分悬浮细胞。12,000×g 再次离心 1 分钟。吸弃上清，保留沉淀。

3. 在沉淀中加入 1mL 核酸提取缓冲液，吹打混匀至沉淀完全消失。

4. 室温（25℃）放置 5 分钟。

【操作步骤】

1. 在含上述处理样本的 1.5mL 离心管中，以每 1mL 核酸提取缓冲液加入 0.2mL 的氯仿，闭盖，剧烈震荡 15 秒。

2. 室温（15-25℃）放置 3 分钟。

3. 12,000×g 4℃离心 15 分钟。

4. 转移上清液至新的 2mL 离心管中，加入 1.5 倍上清体积的无水乙醇，吹打混匀。

➢吸取上清过程中避免吸入白色中间层。

5. 4℃ 12,000×g 离心 10 分钟，弃上清，RNA 沉淀于管底。

6. 加入 1mL 80%乙醇，温和悬浮沉淀。

7. 4℃ 10,000×g 离心 5 分钟，尽量弃上清。

8. 室温晾干或真空干燥 5 分钟。

➢RNA 样品不能过于干燥，否则很难溶解。

9. 用适量 DEPC 水或 TE（pH8.5）溶解 RNA 样本，-80℃保存备用。

【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）