

通用 RNA 提取试剂盒（Trizol-沉淀法）使用说明书

【预期用途】

通用 RNA 提取试剂盒（Trizol-沉淀法）用于从各种样本中分离纯化病毒、细胞、细菌等生物体的总 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	数量
MDT-R01-TC	核酸提取缓冲液	100mL×1 瓶
	消化液	2mL×1 支
	使用说明书	1 份

消化液：常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

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】 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. 提前配制消化缓冲液。
4. 提取过程中必须全程使用 RNase-free 离心管和 Tip 头。
5. 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。
6. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

新鲜的全血、血清、血浆、痰液、脓液、宫颈粘液、粪便、尿液、胸腔积液、羊水、胸腹水、肺泡灌洗液、脑脊液、组织渗出液、组织浸出液、各种拭子（宫颈刷）、噬菌体原液、细胞（细菌）培养物。

【适用范围】

≤5.0×10⁶ 个细胞（脱落细胞）；≤2.0×10⁹ 个革兰氏阴性细菌。

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

- **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。
- **70%乙醇水溶液配制：**3 份水加入 7 份无水乙醇，配制成 70%乙醇水溶液，混匀后密封常温保存。
- **消化缓冲液配制：**使用前每 1mL 生理盐水中加入 40 μ L 的消化液，配制成消化缓冲液。即用即配。

【样本处理】

1 全血、血清、血浆和噬菌体标本

取 200 μ L 样本（血清、血浆或经过 0.22 μ m 滤菌器过滤除菌的噬菌体原液）加入 1.5mL 离心管中，加入 1mL 核酸提取缓冲液，吹打混匀。

2 痰液、脓液、宫颈粘液和粘液型粪便等样本

2.1 在痰液（脓液、宫颈粘液或粘液型粪便）中加入 5 倍体积的消化缓冲液，室温充分振荡，使粘液完全液化。

2.2 在 1.5mL 离心管中加入一定量液化后的样本，12,000 $\times g$ 离心 1 分钟。吸弃上清，保留沉淀。

3.3 在沉淀中加入 1mL 核酸提取缓冲液，吹打混匀。

3 固体粪便样本

3.1 在 1.5mL 离心管中，加入 1mL 核酸提取缓冲液和 20mg 粪便（黄豆大小），3,000rpm 振荡 3 分钟。

3.2 瞬时离心，吸取上清至新的 1.5mL 离心管中。

4 尿液、胸腔积液、羊水、胸腹水、肺泡灌洗液、脑脊液、组织渗出液、组织浸出液、水样粪便等样本

4.1 在 1.5mL 离心管中加入一定量新鲜的样本，12,000 $\times g$ 离心 2 分钟。吸弃上清，保留沉淀。

4.2 在沉淀中加入 1mL 核酸提取缓冲液，吹打混匀。

5 细胞和革兰氏阴性细菌样本

5.1 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。

5.2 各种拭子（宫颈刷）：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，保留细胞（细菌）沉淀。

5.3 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，保留细胞（细菌）沉淀。

5.4 细胞保存液保存的细胞：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×g 离心 1 分钟。弃上清，保留细胞沉淀。

5.5 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，加入含 1mL 生理盐水的 1.5mL 离心管中充分混匀。12,000×g 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

5.6 在上述沉淀（“细胞和革兰氏阴性细菌样本”中的“步骤 5.1-5.5”）中加入 1mL 核酸提取缓冲液，吹打混匀。

5.7 贴壁生长细胞

5.7.1 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。

5.7.2 转移 6 孔培养板（瓶/皿）中所有“核酸提取缓冲液”至一个新的 1.5mL 离心管中。

6 革兰氏阳性细菌和真菌（酵母）标本

6.1 收集 10^7 的革兰氏阳性或真菌（酵母）细胞，12,000×g 离心 1 分钟，弃上清。用 50μL 生理盐水悬浮细胞，转移至预冷的研钵中，加液氮磨成粉末。

6.2 将细胞粉末转移至 1.5mL 离心管中，将液氮充分挥发。

6.3 加入 1mL 核酸提取缓冲液，吹打混匀。

【操作步骤】

1. 将含上述处理样本的 1.5mL 离心管室温 (15-25°C) 放置 5 分钟。
2. 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。
3. 室温 (15-25°C) 放置 3 分钟。
4. 12,000×g 4°C离心 15 分钟。
5. 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。

6. 4°C 12,000×g 离心 10 分钟，弃上清，RNA 沉淀于管底。
7. 加入 1mL 70%乙醇，充分悬浮沉淀。
8. 12,000×g 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

▶弃上清时务必小心，保证沉淀不丢失。

9. 50°C，开盖干燥 5 分钟。干燥过程中再次吸弃残留液体。

▶RNA 样品不能过于干燥，否则很难溶解。

10. 用适量 DEPC 水或 TE (pH8.5) 溶解 RNA 样本，-80°C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)