

组织（细胞）RNA 提取试剂盒（Trizol-柱式法）使用说明书

【预期用途】

组织（细胞）RNA 提取试剂盒（Trizol 柱式法）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，而 DNA 和蛋白质保留在中间相或下层有机相中。吸取上层水相，在核酸提取缓冲液高盐低 pH 的环境下，吸附柱内的硅胶膜吸附 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 RNA，从而达到快速分离纯化 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-TZ	核酸提取缓冲液	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	100mL×2 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

所有成分：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. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
4. 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。
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、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】

≤5.0×10⁶ 个细胞；≤2.0×10⁹ 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、PBS、生理盐水、氯仿、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， $12,000\times g$ 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）， $12,000\times g$ 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°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. **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， $12,000\times g$ 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。加入 1mL 核酸提取缓冲液，轻轻晃动培养板（瓶/皿），使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°C ）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， $12,000\times g$ 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， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。
2. 在沉淀中加入 500 μL 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°C ）放置 5 分钟。

【操作步骤】

1. 在含上述已处理样本的 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（ $15\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ）放置 3 分钟。
3. $12,000\times g$ 4°C 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。将吸附柱放入收集管中，吸取 700 μL 混合液转移至吸附柱中。
▶吸取上清过程中避免吸入白色中间层；
▶提取组织样本时，用 350 μL 异丙醇替代 1.5 倍上清体积的无水乙醇也能获得满意的提取效果。
5. 闭盖 $12,000\times g$ 室温离心 30 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管。
6. 重复“步骤 5”，至混合液完全过柱（最后 1 次过柱， $12,000\times g$ 离心 1 分钟）。
7. 开盖，在吸附柱中加入 600 μL RAW1，闭盖 $12,000\times g$ 室温离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管。
8. 开盖，在吸附柱中加入 600 μL 80%乙醇水溶液，闭盖 $12,000\times g$ 室温离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管。
9. 开盖，在吸附柱中加入 600 μL 80%乙醇水溶液，闭盖 $12,000\times g$ 室温离心 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。
10. 闭盖 $12,000\times g$ 离心 3 分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。
11. 将吸附柱转入新的 1.5mL 离心管中，加入 50 μL 洗脱液 A 至吸附柱中心。闭盖室温静置 1 分钟，闭盖， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，收集洗脱液，备用。
▶洗脱液 A 的用量可以根据需要调整，但用量不得低于 30 μL 。
▶洗脱液 A 的使用量少会影响提取效果。

【组织（细胞）RNA 提取（Trizol 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.无水乙醇（异丙醇）使用量不正确	按说明书准确加入无水乙醇（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℃ 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 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.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	吸取氯仿萃取后的上清时，吸收到中间 DNA 层。	避免到 DNA 层。

【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）