通用 RNA 提取试剂盒（Trizol-柱式法）使用说明书

【预期用途】

通用 RNA 提取试剂盒（Trizol-柱式法）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，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-R01-TZ	消化液	1mL×1 支	2mL×1 支	4mL×1 瓶
	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

消化液：常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

其他成分：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. 提前配制消化缓冲液。
4. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
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】

≦5.0×10^6 个细胞（脱落细胞）；≦2.0×10^9 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≥12,000×g）、高速匀浆器（研钵、液氮）、1.5mL 和 2mL 离心管、生理盐水、PBS、氯仿和无水乙醇等。

- **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。
- **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。
- **消化缓冲液配制：**使用前每 1mL 生理盐水中加入 40μL 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 200μL 样本（血清、血浆、或经过 0.22μm 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×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 5,000rpm 离心 10 秒。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×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℃）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℃）放置 3 分钟。

4. 12,000×g 4℃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。将吸附柱放入收集管中，吸取 700μL 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。

6. 闭盖 12,000×g 离心 30 秒。取出吸附柱，弃去废液，将吸附柱重新放入收集管。

7. 重复 **“步骤 6”**，至混合液完全过柱（最后 1 次过柱，12,000×g 离心 1 分钟）。

8. 开盖，在吸附柱中加入 600μL RAW1，闭盖 12,000×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。

9. 开盖，在吸附柱中加入 600μL 80%乙醇水溶液，闭盖 12,000×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。

10. 开盖，在吸附柱中加入 600μL 80%乙醇水溶液，闭盖 12,000×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。

11. 闭盖 12,000×g 离心 3 分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。

12. 将吸附柱转入新的 1.5mL 离心管中，加入 50μL 洗脱液 A 至吸附柱中心。闭盖室温静置 1 分钟，闭盖，12,000×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，但不得低于 30μL。

➢洗脱液 A 的使用量太少会影响提取效果。

【通用 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，但细胞（脱落细胞）≦5.0×10^6 个；革兰氏阴性细菌≦2.0×10^9 个。
	2.痰液等需要消化的样本消化不充分	增加消化液使用，延长消化时间。
	3. 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
	4.无水乙醇使用量不正确	按说明书准确加入无水乙醇。
	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_2O 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_2O 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，吸取到中间 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）