



上海普洛麦格生物产品有限公司

技术手册

V3.7

Eastep[®] Super 总 RNA 提取试剂盒 (Eastep[®] Super Total RNA Extraction Kit)

产品目录号：LS1040

目 录

■	产品描述.....	1
■	试剂盒组分.....	1
■	存储条件.....	1
■	试剂配制.....	2
■	预防 RNase 污染的注意事项.....	2
■	不同细胞的破碎方法.....	2
■	不同样品起始用量.....	3
■	RNA 分离纯化流程图.....	4
■	从动物组织中提取 RNA.....	5
■	从贴壁或悬浮细胞中提取 RNA.....	6
■	从植物组织中提取 RNA.....	8
■	从革兰氏阳性（枯草杆菌）和革兰氏阴性（大肠杆菌）细菌中提取 RNA.....	10
■	不同材料提取 RNA 的得率.....	11
■	问题及解决办法.....	12
■	附录.....	14
1.	PBS 缓冲液, (10x), pH 7.4.....	14
2.	胰蛋白酶-EDTA 溶液(1x).....	14
3.	1xTE 缓冲液, pH 8.0.....	14

■ 产品描述

RNA 的纯度和完整性在 RT-PCR、qRT-PCR、RNase 保护、Northern Blot、体外翻译和微阵列分析等分子生物学实验中至关重要。近年来，RT-PCR 和 qRT-PCR 已经演变成定性、定量分析某些特定 mRNA 的有力工具。随着基因扩增技术的不断成熟，从组织、培养细胞等小量样本中快速纯化得到无基因组 DNA 污染的高质量 RNA 的需求越来越迫切，Eاستep® Super 总 RNA 提取试剂盒也因此应运而生。

Eاستep® Super 总 RNA 提取试剂盒 (LS1040) 为客户提供了一套从动物组织、植物组织、培养细胞、细菌中小量纯化高质量、完整总 RNA 的解决方案。该试剂盒采用独特的细胞裂解系统，无需使用苯酚、氯仿等有害物质，通过离心柱硅基质膜高效、专一地吸附核酸分子，再经 DNA 酶处理去除基因组 DNA 的污染，最终得到高纯度的总 RNA。

本产品具有高效、快速、方便之特点，单个样品提取纯化一般可在 30 分钟内完成。使用该试剂盒提纯的 RNA，不但纯度高，而且基本无 DNA 和影响下游应用酶反应的杂质残留。

■ 试剂盒组分

目录号	名称	规格
LS1040	Eاستep® Super Total RNA Extraction Kit	50 次

试剂盒所包含的试剂，足够对组织、细胞、细菌样本进行 50 次总 RNA 的提取

组分号	组分名称	规格
SR220A	RNA 裂解液	40ml
SR221A	RNA 稀释液	30ml
SR222A	RNA 洗液	40ml
SR223A	10XDNA 酶 I 缓冲液	0.3ml
SR224A	1-硫代甘油	1ml
SR120A	DNA 酶 I (冻干粉)	1 瓶
SP119A	无核酸酶水	13ml
SR320A	离心柱/收集管 (50 套/包)	1 包
SR321A	洗脱管 (50 个/包)	1 包
	说明书	1 份

■ 存储条件

在收到试剂盒后，请将其中的 10XDNA 酶 I 缓冲液和 1-硫代甘油于 4℃ 保存。其它组分于 +15℃ 到 +30℃ 保存。配制好的 DNA 酶 I 分装后于 -20℃ 保存，加入 1-硫代甘油的 RNA 裂解液于 +4℃ 保存可至 6 个月。

警告：1-硫代甘油是低毒挥发液体，请戴手套并按照安全操作流程进行操作。当处理人源、感染的组织或者血液样品时，亦请参照安全操作流程作业并妥善处置有害物质。

■ 试剂配制

在准备提取 RNA 操作之前，先准备好下列 3 种溶液。

溶液	准备步骤	注意事项
DNA酶I	按DNA酶I（冻干粉）瓶标所示，加入550μl无核酸酶水（试剂盒已提供），DNA酶I溶液终浓度为2-4u/μl	用移液器轻轻吹打混匀，不要震荡。我们建议将溶解后的DNA酶I分装到无核酸酶的EP管内（如，分成5-10等份）并于-20℃保存。单次RNA的提取需要使用5μl DNA酶I。 ↓不要震荡DNA酶I溶液 ↓不要超过3次反复冻融DNA酶I溶液
RNA裂解液	将1-硫代甘油按2%（V/V）加入到RNA裂解液中。	加入1-硫代甘油后，即在瓶子上做好标记。将RNA裂解液保存在4℃环境，保存期6个月，每次使用后，请拧紧瓶盖。
RNA洗液	向40ml浓缩的RNA洗液中加入70ml无水乙醇。	加入乙醇后，即在瓶子上做好标记。试剂可保存于15-30℃环境中，请拧紧瓶盖。 ↓本产品呈淡黄色属正常现象。

■ 预防 RNase 污染的注意事项

为防止在提取 RNA 过程中外源 RNA 酶的污染，必须采取以下措施：

- 1、戴一次性干净手套和口罩操作，防止皮肤、唾液和实验室用品上存在的 RNase 污染。
- 2、使用无菌无 RNase 的塑料制品和 Tip 头。
- 3、若使用玻璃器皿须经过 0.1%DEPC 水在 37℃下浸泡 12 小时，然后经过 121℃高压灭菌 30 分钟，烘干后使用。
- 4、配制相应的试剂必须使用经过 121℃高压灭菌的 0.1%DEPC 水。

■ 不同细胞的破碎方法

为确保RNA抽提成功，选择合适的细胞破碎方法，保证样品在内源RNase作用前得到充分裂解是至关重要的。具体为：细菌采用溶菌酶破壁；植物组织要用液氮碾磨破碎；动物组织可用组织匀浆器或液氮碾磨破碎。而选择液氮碾磨是破碎细胞的最佳方案。不同材料的裂解方法详见本手册各章节所描述的裂解物的制备。

使用液氮破碎细胞要特别注意：在整个液氮碾磨过程中，必须不断添加液氮，避免样品融化，在碾磨结束样品融化前必须立刻加入裂解液，用移液枪反复吹打直到裂解物中无明显块状组织。有些样品（如胰脏）含有大量核酸、细胞碎片和蛋白质，如果加入RNA裂解液后，裂解混合物很粘稠不易吸取时，可以使用20G（或国产9号注射针头）的注射器来回吸放数次，使裂解物便于吸取即可。

匀浆好的裂解物可以保存在-70℃备用。如果收集的样品不立即进行RNA的提取工作，就需要将离体后的组织迅速投入液氮冻住后再保存于-70℃冰箱或直接保存于液氮中直到使用，防止反复冻融。

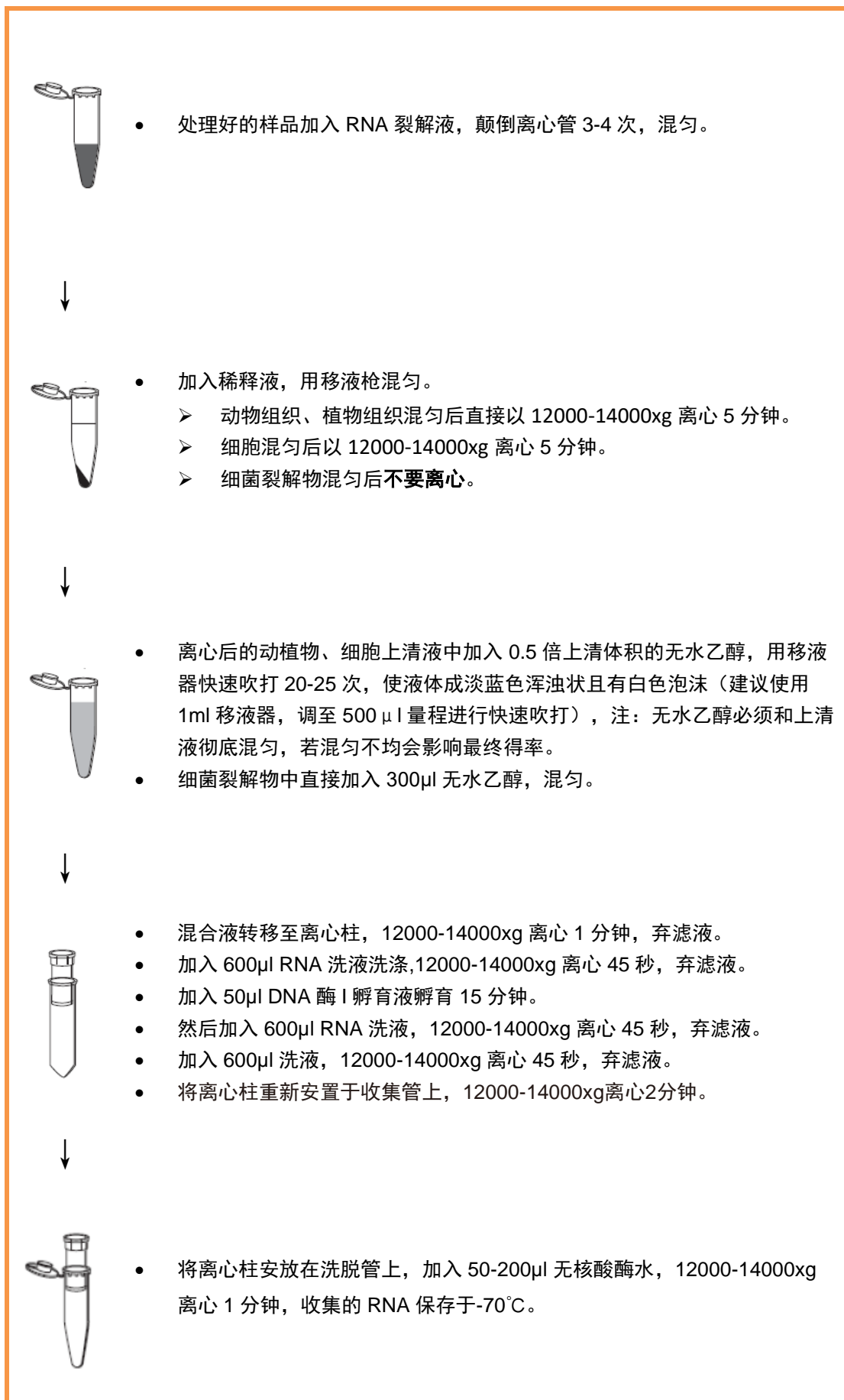
■ 不同样品起始用量

样品的起始用量对 RNA 的提取效果有很大影响，任何裂解系统在接近可兼容的样品最大起始量时，都可能会因为裂解效果不佳导致抽提效果明显下降。在实验之前，请参考表 1：**不同样品起始用量与裂解液，稀释液的使用量**进行裂解物的制备。对含基因组 DNA 特别丰富的组织（如：脾脏）应减少起始用量。当抽提的 RNA 质量欠佳时，考虑解决的办法之一是降低样品的起始用量。如果样本足够多，想获得多一点提纯的 RNA，可以按比例放大样品处理量以及后继各试剂用量，普通动物组织可以放大到 40mg，植物组织可以放大到 100mg。分批上样过柱。

表 1.不同样品起始用量与裂解液，稀释液的使用量

样品名称	样品起始用量	裂解液使用量	稀释液使用量
普通动物组织（肝脏、肾脏、心、肺、脑，等）	5-20mg	300μl	300μl
普通动物组织（肝脏、肾脏、心、肺、脑，等）	20-40mg	500μl	500μl
特殊动物组（脾脏等）	5-10mg	300μl	300μl
细胞	1.5×10^3 - 5×10^6	300μl	300μl
植物组织（叶片，茎）	30-50mg	300μl	300μl
植物组织（叶片，茎）	50-100mg	500μl	500μl
细菌，OD ₆₀₀ 达 0.6-1.0 时	1ml	200μl	300μl

■ RNA 分离纯化流程图



■ 从动物组织中提取 RNA

准备下列材料：

- 小型组织匀浆器或碾钵及液氮（如：Brinkmann, Tissuemizer® 或 Omini Micro homogenizer）
- 无水乙醇
- 小型离心机

操作方法

1、裂解物的制备

按照以下两种方法进行裂解物的制备：

- ① 必须使用新鲜或超低温冻存的组织。迅速将组织放入无核酸酶的 1.5ml EP 管或匀浆管中，按起始量加入 RNA 裂解液（裂解液加入量见表 1），置冰浴中，用组织匀浆器破碎细胞。
- ② 必须使用新鲜或超低温冻存的组织。迅速将组织投入到已加入液氮的碾钵中进行碾磨，碾磨过程中要不断补充液氮，以防止组织融化，直至组织完全碾磨成粉末状。将碾磨成粉末状的样品迅速转稳到无核酸酶的 1.5ml EP 管中称量，待剩余液氮将要挥发尽时加入裂解液（裂解液加入量见表 1），用移液枪反复吹打直到裂解物中无明显块状组织。

2、向裂解物中加入 RNA 稀释液（稀释液加入量见表 1），用移液枪混匀。室温放置 3-5 分钟。

提示：如果动物组织样品来源比较珍贵，可以选择裂解物加入稀释液后置 70℃加热 3 分钟，可以提高 RNA 的得率。

3、室温以 12000-14000xg 离心 5 分钟。

4、小心吸取上清液到新的 1.5ml 无核酸酶的 EP 管中。

提示：离心后，如果在上清液表面形成一层固体状物时，只要在吸取上清前用枪头将固体状物拨到离心管一边即可。

5、加入 0.5 倍上清体积的无水乙醇，用移液器快速吹打 20-25 次，使液体成淡蓝色浑浊状且有白色泡沫（建议使用 1ml 移液器，调至 500 μl 量程进行快速吹打），注：无水乙醇必须和上清液彻底混匀，若混匀不均会影响最终得率。

6、根据样品数量，取出相应数目的离心柱/收集管（离心柱已安放在收集管上）。

7、将混合液转移到离心柱内。（如果混合液体积大于 750μl，需分批加入。每次加入的体积不要超过 750μl）。

8、12000-14000xg 离心 1 分钟。弃滤液，将离心柱重新放回到收集管中。

9、向离心柱中加入 600μl RNA 洗液（已加入乙醇），12000-14000xg 离心 45 秒，弃滤液。

10、DNA 酶 I 消化

DNA 酶 I 要新鲜配制。取一无核酸酶 EP 管，加入下列试剂。以下是提取一管 RNA 需要的 DNA 酶 I 孵育液的用量。

试剂	体积
10XDNA酶I缓冲液	5μl
DNA酶I	5μl

无核酸酶水 40μl

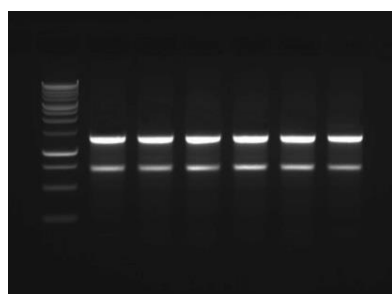
注意：轻轻吸放混匀，不要振荡。

- 11、向离心柱中央加入 50μl 新鲜配制的 DNA 酶 I 孵育液，室温静置 15 分钟。
- 12、向离心柱中加入 600μl RNA 洗液，12000-14000xg 离心 45 秒，弃滤液。
- 13、向离心柱中加入 600μl RNA 洗液，12000-14000xg 离心 45 秒，弃滤液。将离心柱重新安置于收集管上，12000-14000xg 离心 2 分钟。
- 14、将离心柱转移至洗脱管上（试剂盒提供），在离心柱膜中央加入 50-200μl 无核酸酶水，室温静置 2 分钟，12000-14000xg 离心 1 分钟，将 RNA 保存在-70℃。

提示：如果将第一次洗脱下来的洗脱液重新加回到离心柱中央，室温静置 2 分钟，12000-14000xg 离心 1 分钟再次洗脱 RNA，可以提高 RNA 得率。

实验例：应用本试剂盒提取的小鼠肝，肾，肺，脾，脑，心脏组织 RNA

M 1 2 3 4 5 6



M: Promega λDNA Marker;

1: 小鼠肝脏; 2: 小鼠肾脏; 3: 小鼠肺;
4: 小鼠脾; 5: 小鼠脑; 6: 小鼠心脏;

电泳条件: RNA 上样量 2000ng, 1%琼脂糖凝胶,
110V, 30 分钟。

■ 从贴壁或悬浮细胞中提取 RNA

使用下列操作步骤裂解贴壁或悬浮细胞。每一样品细胞量在 1.5×10^3 到 5×10^6 之间。应根据细胞的类型、功能和收获时RNA表达水平优化所需的细胞数量。

准备下列材料：

- 1× PBS 溶液（无菌）
- 无水乙醇
- 小型离心机

操作方法

1、 细胞裂解物的制备

贴壁细胞裂解物的制备：贴壁细胞样品可按下列两种方法之一制备。第一种方法用胰酶-EDTA 溶液使细胞松动脱落；第二种方法手动刮取细胞。

- **胰蛋白酶处理方法：**

准备试剂（配方见附录）：

1×胰酶-EDTA 溶液（无菌）

1×PBS（无菌）

- ① 倒掉培养液，用无菌 1×PBS 溶液洗涤细胞，然后加入正好能盖住单层细胞的胰酶溶液：如 150mm 培养瓶需加入 2ml 胰酶溶液，100mm 培养皿需加入 1ml 胰酶溶液。轻轻晃动器皿使胰酶均匀分布在细胞层上，直到细胞松动（一般 1-2 分钟）。
 - ② 一旦细胞松动，尽快弃去胰酶溶液（倾斜平皿或培养瓶以使用枪头尽量吸去多余的溶液），加入 1×PBS 溶液，用移液枪吹下贴壁的细胞。
 - ③ 将细胞连同 PBS 溶液一起收集到无核酸酶的 EP 管中，300-500xg（1100-1500 rpm）离心 5 分钟，弃上清，收集沉淀细胞。
 - ④ 加入 RNA 裂解液 300 μl，用移液枪吸放打散沉淀，混匀，并将裂解物转移至 1.5ml 无核酸酶 EP 管中。
- **刮取式分离方法：**对生长在多孔板上的细胞，根据细胞类型和孔径大小，每孔细胞数 3.5×10^4 到 1×10^6 个。
 - ① 倒掉培养基，加入适量无菌 1×PBS 溶液，用移液枪吹打细胞，直到细胞全部脱离瓶底为止。对于贴壁牢固的培养细胞，可以用细胞刮勺剥离细胞。
 - ② 将细胞连同 PBS 溶液一起收集到无核酸酶的 EP 管中，300-500xg（1100-1500 rpm）离心 5 分钟，弃上清，收集沉淀细胞。
 - ③ 加入 RNA 裂解液 300 μl，用移液枪吸放打散沉淀，混匀，并将裂解物转移至 1.5ml 无核酸酶 EP 管中。

悬浮细胞裂解物的制备：

- ① 将悬浮的细胞连同培养液一起倒入无核酸酶的 EP 管中，300-500xg（1100-1500 rpm）离心 5 分钟。使用无菌 1×PBS 溶液洗涤沉淀的细胞，300-500xg（1100-1500 rpm）离心 5 分钟，弃上清，收集沉淀的细胞。
 - ② 加入 RNA 裂解液 300 μl，用移液枪吸放打散沉淀，混匀，并将裂解物转移至 1.5ml 无核酸酶 EP 管中。
- 2、向裂解物中加入 RNA 稀释液 300 μl，颠倒离心管 3-4 次混匀，室温放置 3-5 分钟。

提示：如果细胞样品来源比较珍贵，可以选择裂解物加入稀释液后置 70°C 加热 3 分钟，可以提高 RNA 的得率。
 - 3、12000-14000xg 离心 5 分钟。
 - 4、小心吸取上清液到新的 1.5ml 无核酸酶 EP 管中。
 - 5、加入 0.5 倍上清体积的无水乙醇，用移液器快速吹打 20-25 次，使液体成淡蓝色浑浊状且有白色泡沫（建议使用 1ml 移液器，调至 500 μl 量程进行快速吹打），注：无水乙醇必须和上清液彻底混匀，若混匀不均会影响最终得率。
 - 6、取出离心柱/收集管（离心柱已安放在收集管上）。

7、将混合液转移到离心柱内。(如果混合液体积大于 750 μ l, 需分批加入。每次加入的体积不要超过 750 μ l)。

8、12000-14000xg 离心 1 分钟。弃滤液, 将离心柱重新放回到收集管中。

9、向离心柱中加入 600 μ l RNA 洗液(已加入乙醇), 12000-14000xg 离心 45 秒, 弃滤液。

10、DNA 酶 I 消化

DNA 酶 I 要新鲜配制。取一无核酸酶 EP 管, 加入下列试剂。以下是提取一管 RNA 需要的 DNA 酶 I 孵育液的用量。

试剂	体积
10XDNA酶I缓冲液	5 μ l
DNA酶I	5 μ l
无核酸酶水	40 μ l

注意: 轻轻吸放混匀, 不要振荡。

11、向离心柱中央加入 50 μ l 新鲜配制的 DNA 酶 I 孵育液, 室温静置 15 分钟。

12、向离心柱中加入 600 μ l RNA 洗液, 12000-14000xg 离心 45 秒, 弃滤液。

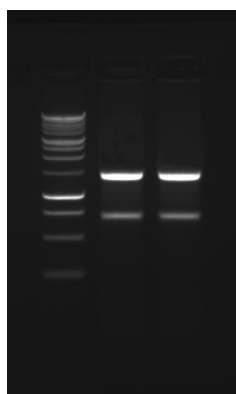
13、向离心柱中加入 600 μ l RNA 洗液, 12000-14000xg 离心 45 秒, 弃滤液。将离心柱重新安置于收集管上, 12000-14000xg 离心 2 分钟。

14、将离心柱转移至洗脱管上(试剂盒提供), 在离心柱膜中央加入 50-200 μ l 无核酸酶水, 室温静置 2 分钟, 12000-14000xg 离心 1 分钟, 将 RNA 保存在-70 $^{\circ}$ C。

提示: 如果将第一次洗脱下来的洗脱液重新加回到离心柱中央, 室温静置 2 分钟, 12000-14000xg 离心 1 分钟再次洗脱 RNA, 可以提高 RNA 得率。

实验例: 应用本试剂盒提取的 1×10^6 培养的 293T 细胞 RNA

M 1 2



M: Promega λ DNA Marker;
1, 2: 293T 细胞 RNA

电泳条件: RNA 上样量 1800ng, 1%琼脂糖凝胶,
110V, 30 分钟。

■ 从植物组织中提取 RNA

准备下列材料:

- 碾钵和液氮
- 无水乙醇
- 小型离心机

操作方法

1、植物组织裂解物的制备

必须使用新鲜或超低温冻存的组织。迅速将组织投入到已加入液氮的碾钵中进行碾磨。碾磨过程中要及时补充液氮，以防止组织融化，直至组织完全碾磨成粉末状。将碾磨成粉末状的样品迅速转稳到无核酸酶的 EP 管中称量，按表 1 **不同样品起始用量与裂解液，稀释液的使用量**加入裂解液，用移液枪反复吹打直到裂解物中无明显块状组织。

- 2、按表 1 **不同样品起始用量与裂解液，稀释液的使用量**加入 RNA 稀释液，颠倒离心管 3-4 次混匀，室温放置 3-5 分钟。
- 3、室温，在小型离心机中以 12000-14000xg 离心 5 分钟。
- 4、小心吸取上清液到新的 1.5ml 无核酸酶 EP 管中。

提示：离心后，如果在上清液表面形成一层固体状物时，只要在吸取上清前用枪头将固体状物拨到离心管一边即可。

- 5、加入 0.5 倍上清体积的无水乙醇，用移液器快速吹打 20-25 次，使液体成淡蓝色浑浊状且有白色泡沫（建议使用 1ml 移液器，调至 500 μ l 量程进行快速吹打），注：无水乙醇必须和上清液彻底混匀，若混匀不均会影响最终得率。
- 6、取出离心柱/收集管（离心柱已安放在收集管上）。
- 7、将混合液转移到离心柱内。
- 8、12000-14000xg 离心 1 分钟。弃滤液，将离心柱重新放回到收集管中。
- 9、向离心柱中加入 600 μ l RNA 洗液（已加入乙醇），12000-14000xg 离心 45 秒，弃滤液。

10、DNA 酶 I 消化

DNA 酶 I 要新鲜配制。取一无核酸酶 EP 管，加入下列试剂。以下是提取一管 RNA 需要的 DNA 酶 I 孵育液的用量。

试剂	体积
10XDNA酶I缓冲液	5 μ l
DNA酶I	5 μ l
无核酸酶水	40 μ l

注意：轻轻吸放混匀，不要振荡。

- 11、向离心柱中央加入 50 μ l 新鲜配制的 DNA 酶 I 孵育液，室温静置 15 分钟。
- 12、向离心柱中加入 600 μ l RNA 洗液，12000-14000xg 离心 45 秒，弃滤液。

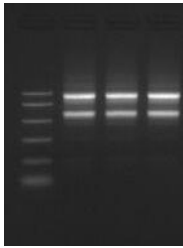
13、向离心柱中加入 600 μ l RNA 洗液，12000-14000xg 离心 45 秒，弃滤液。将离心柱重新安置于收集管上，12000-14000xg 离心 2 分钟。

14、将离心柱转移至洗脱管上（试剂盒提供），在离心柱膜中央加入 50-200 μ l 无核酸酶水，室温静置 2 分钟，12000-14000xg 离心 1 分钟，将 RNA 保存在-70 $^{\circ}$ C。

提示：如果将第一次洗脱下来的洗脱液重新加回到离心柱中央，室温静置 2 分钟，12000-14000xg 离心 1 分钟再次洗脱 RNA，可以提高 RNA 得率。

实验例：应用本试剂盒提取的番茄叶子 RNA

M 1 2 3



M: Promega PCR Marker

1, 2: 番茄叶子 RNA

电泳条件：RNA 上样量 1000ng，1%琼脂糖凝胶，110V，30 分钟。

■ 从革兰氏阳性（枯草杆菌）和革兰氏阴性（大肠杆菌）细菌中提取 RNA

注意：对某些葡萄球菌，要用60 μ l 10mg/ml溶菌酶和60 μ l 10mg/ml的溶葡萄球菌素 (lysozyme)的混合液才能有效溶解。不过，许多革兰氏阳性细菌（如：*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Arthrobacter luteus*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous* and *Brevibacterium albidum*）仅需溶菌酶即可进行有效溶解。

准备下列材料：

- 溶菌酶
- 无水乙醇
- 小型离心机

操作方法

- 1、在合适的培养基、合适的温度中过夜培养细菌。第二天，按 1:50 的比例接种并培养至 OD₆₀₀ 达 0.6-1.0，可能只需要几小时，如果生长太慢，可以加大接种量。
- 2、向 1.5ml 离心管中加入 1ml 细菌培养液，12000-14000xg 离心 2 分钟。
- 3、小心地、尽可能多地除去上清，留下细菌沉淀。
- 4、用 100 μ l 新鲜配置的含溶菌酶的 TE 缓冲液重悬沉淀。革兰氏阳性细菌可使用 3mg/ml（终浓度）的溶菌酶；革兰氏阴性细菌则可采用 0.4mg/ml（终浓度）的溶菌酶，轻轻敲打混匀。
- 5、室温孵育，革兰氏阳性菌孵育 5-10 分钟；革兰氏阴性菌孵育 3-5 分钟。
- 6、加入 200 μ l RNA 裂解液，用移液枪吹打混匀。
- 7、加入 300 μ l RNA 稀释液，颠倒离心管 3-4 次以混匀，不要离心。

注意：这一步不要离心，否则RNA会损失到裂解物中。

- 8、加入 300 μ l 无水乙醇，用移液器快速吹打 20-25 次，使液体成淡蓝色浑浊状且有白色泡沫（建议使用 1ml 移液器，调至 500 μ l 量程进行快速吹打），注：无水乙醇必须和上清液彻底混匀，若混匀不均会影响最终得率。
- 9、取出离心柱/收集管（离心柱已安放在收集管上）。
- 10、将混合液转移到离心柱内。
- 11、12000-14000xg 离心 1 分钟，弃滤液，将离心柱重新放回到收集管中。
- 12、向离心柱中加入 600 μ l RNA 洗液（已加入乙醇），12000-14000xg 离心 45 秒，弃滤液。
- 13、DNA 酶 I 消化

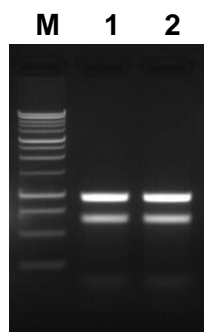
DNA 酶 I 要新鲜配制。取一无核酸酶 EP 管，加入下列试剂。以下是提取一管 RNA 需要的 DNA 酶 I 孵育液的用量。

试剂	体积
10X DNA 酶 I 缓冲液	5 μ l
DNA 酶 I	5 μ l
无核酸酶水	40 μ l

注意：轻轻吸放混匀，不要振荡。

- 14、向离心柱中央加入 50 μ l 新鲜配制的 DNA 酶 I 孵育液，室温静置 15 分钟。
- 15、向离心柱中加入 600 μ l RNA 洗液，12000-14000xg 离心 45 秒，弃滤液。
- 16、向离心柱中加入 600 μ l RNA 洗液，12000-14000xg 离心 45 秒，弃滤液。将离心柱重新安置于收集管上，12000-14000xg 离心 2 分钟。
- 17、将离心柱转移至洗脱管上（试剂盒提供），在离心柱膜中央加入 50-200 μ l 无核酸酶水，室温静置 2 分钟，12000-14000xg 离心 1 分钟，将 RNA 保存在 -70 $^{\circ}$ C。

实验例：应用本试剂盒提取的 E.coli 1×10^9 细胞 RNA



M: Promega λ DNA Marker

1, 2: E.coli 细胞 RNA

电泳条件：RNA 上样量 600ng，1%琼脂糖凝胶，100V，40 分钟。

■ 不同材料提取 RNA 的得率

样品种类	样品名称	RNA 收获(μ g/mg)	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
动物组织	小鼠肝脏	3.0-5.5	2.0-2.5	1.9-2.1

	小鼠肾脏	1.5-3.0	2.0-2.5	1.9-2.1
	小鼠脾脏	1.5-3.5	2.1-2.6	1.9-2.1
	小鼠心脏	0.4-1.0	2.0-2.6	1.9-2.1
	小鼠肺	0.6-1.2	2.2-3.0	1.9-2.1
	小鼠脑	0.4-0.8	2.1-2.7	1.9-2.1
植物组织	番茄叶子	1.0-2.0	2.1-2.6	1.9-2.2
细胞	293T (1×10 ⁶)	8-12/次	2.0-2.3	1.9-2.1
	Hela Cell (1×10 ⁶)	20/次	2.0-2.3	1.9-2.1
细菌	E.Coli (1×10 ⁹)	30-50/次	2.2-2.6	1.9-2.1

表 2.不同材料提取 RNA 的得率

■ 问题及解决办法

1、 A_{260}/A_{230} 低

A_{260}/A_{230} 正常范围 ≥ 1.8 ，低于此值，则表明有异硫氰酸胍的污染。造成污染的原因可能：

- 在操作过程中,异硫氰酸胍残液沾到离心柱的外壁上清洗不干净而污染 RNA 溶液。LS1040 试剂盒的离心柱和收集管的特别设计的结构,基本不会出现这种情况。如果 RNA 溶液中存在异硫氰酸胍污染,将会不同程度影响下游应用时酶的反应效果。
- 解决办法:在 RNA 溶液中加入 NaCl 溶液,最终浓度为 0.1M,然后加 2.5 倍无水乙醇, -20°C 30 分钟, 4°C 10000g 离心 15 分钟,用无核酸酶水重悬 RNA。

2、提取的 RNA 发生降解

质量较好的 A_{260}/A_{280} R 值应在 1.9-2.1 之间,当 $R < 1.8$ 时,溶液中的蛋白质等有机物的污染程度比较明显;当 R 值 > 2.2 时,则表明 RNA 已经降解。则可能的原因是:

- 样品不够新鲜,在加入裂解液前,样品已经降解。应当使用新鲜的组织材料,如果不马上进行 RNA 提取,应将材料在液氮中速冻后置 -70°C 冰箱保存或直接保存在液氮中。
- 样品在裂解过程中发生降解。操作前请仔细阅读本手册,选择合适的样品裂解方法,尤其裂解动植物组织样品时,请始终保持低温下操作,裂解过程中操作时间越短越好。
- 在提取 RNA 过程中,使用的器具或环境不干净,造成 RNA 酶污染。操作前请参考**预防 RNase 污染的注意事项**。
- 提取的组织材料中含有大量的 RNA 分解酶。RNA 分解酶较多的组织或细胞应当减少样品起始量。比如提取动物组织的脾脏应减少起始用量。操作前请参考本手册**不同样品的最适起始用量**。

3、 A_{260} 低 (得率低)

使用 LS1040 试剂盒提取的不同样品的得率请参考表 2 **不同材料提取 RNA 的得率**,如果 RNA 得率过低,可能有以下因素造成:

- 使用保存在-70°C的样品，其提取的 RNA 得率要低于新鲜样品。保存时间越久得率越低。
- 样品称量时带入的水分（或液氮）比较多，导致计算得率时与实际重量之间的误差。
- 样品起始量太多。操作前请参考本手册**不同样品的最适起始用量**。
- 样用裂解不充分。操作前请参考本手册**不同细胞的破碎方法**。
- 洗脱液中有乙醇残留。洗脱前要离心 2 分钟，除去残留的乙醇。

4、重复性差

- 冻存样品和新鲜样品提取 RNA 的得率有差异。
- 样品起始量太多造成的差异。操作前请参考本手册**不同样品的最适起始用量**。
- 样品裂解不充分，操作前请参考本手册**不同细胞的破碎方法**。
- 当裂解物太过粘稠时没有用 20G 或国产 9 号针头的注射器进一步处理。

5、提取的 RNA 中含基因组 DNA

本试剂盒提供的方法能够很好地除去样品中的基因组 DNA，按照手册操作一般不会有 DNA 的污染。如果提取的 RNA 溶液中含有基因组 DNA，则可能有以下几种原因。

- DNA 酶活性降低。操作前请按手册要求**配制 DNA 酶 I 溶液**，配制时不要震荡 DNA 酶 I 溶液，不要反复冻融 DNA 酶 I 溶液超过 3 次以上，建议将配好的 DNA 酶 I 溶液分装到无核酸酶的 EP 管内。
- 样品裂解不充分。样品裂解不充分会造成基因组 DNA 的残留，操作前请仔细阅读本手册，选择合适的样品裂解方法，尤其裂解动植物组织样品时，请始终保持低温下操作，裂解过程中操作时间越短越好。
- 样品起始量过多。样品起始量过多超过了离心柱的承载量，造成基因组 DNA 的残留。操作前请参考本手册**不同样品的最适起始用量**。对于含基因组 DNA 丰富的组织，降低样品起始用量是唯一有效解决基因组 DNA 的污染的方法。

■ 附录

缓冲液和溶液的配方：

1. PBS 缓冲液, (10×), pH 7.4

11.5g Na₂HPO₄
2g KH₂PO₄
80g NaCl
2g KCl

溶解在 1 升无菌去离子水中

2. 胰蛋白酶-EDTA 溶液(1×)

0.05% Trypsin(w/v)
0.53mM EDTA

溶解于 1×PBS

3. 1×TE 缓冲液, pH 8.0

10mM Tris-HCl
1mM EDTA