

# 操作手册

## 通用微生物 RNA 小量提取试剂盒

Catalog No. TR430-50 (50 次反应)

TR430-50N (50 次反应 不含 DNase I)

### Highlights

- 可从环境样品中（如粪便，土壤，水样，生物膜，拭子，唾液等）提取到无抑制物的 RNA（含 microRNA）。
- 创新的裂解体系可有效的裂解格兰仕阳性/阴性菌，细菌，真菌，藻类，病毒。
- 获得的 RNA 产量高、纯度好，可以直接用于酶切、PCR、芯片，高通量测序等分子生物学实验。
- 此产品仅供科研使用。

## 产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次
裂解管	室温	50 个
核酸保护剂	室温	50 ml
RNA 裂解液	室温	50 ml
RNA 预洗液	室温	2X25 ml
RNA 洗涤液	室温	24 ml
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	30 ml
抑制物去除剂	室温	30 ml
DNase I	室温	1 管
DNA 消化液	室温	4 ml
3 号柱 G	室温	100 个
抑制物去除柱	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	150 个

**Note** –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

## 特性:

- **样品:** 可有效的从 200mg 以内的哺乳动物粪便, 250mg 以内的土壤, 200mg 以内的植物/种子, 50-100mg 以内的真菌细菌细胞, 生物膜, 水和拭子等样品中提取到总 RNA.
- **保存:** 核酸保护剂可有效的裂解细胞, 灭活核酸酶和各种传染样品, 并且对于在常温下运输和保存样品是一种非常理想的试剂。
- **RNA 纯度:** 获得的 RNA 产量高、纯度好, 可以直接用 PCR, 高通量测序等各种分子生物学实验。回收的 RNA 里可能会有微量的 DNA 残留, 根据下游实验, 如要完全去除可用 DNase I 采用柱上消化方法。
- **RNA 大小:** 回收到的 RNA $\geq$ 17 核苷酸。

- **RNA 产量:** 3 号柱 G 的最大 RNA 结合能力为 100 $\mu$ g
- **所需设备:** 台式离心机, 涡旋振荡器, 细胞破碎仪 (推荐)

## 试剂制备

**RNA 洗涤液** 添加 96ml100%无水乙醇 (或 104ml95%无水乙醇) 到 24ml 的 **RNA 洗涤液** 中并做好标记。

**DNase I** 添加275 $\mu$ l RNase-free H<sub>2</sub>O到冻干粉状的**DNase I**管中混匀, **DNase I**终浓度1U/ $\mu$ l,放在-20 $^{\circ}$ C保存。

## 操作步骤:

RNA提取步骤包含2个步骤 (I) 样品制备 (II) RNA纯化

### 样品制备:

以下离心步骤的离心力均在10,000-16,000 x g下进行, 除非特殊说明。

1. 直接添加样品到裂解管中, 然后添加 750 $\mu$ l 的核酸保护剂到裂解管中, 拧紧盖子, 在涡旋仪上振荡 5 分钟以内混匀, 。（如果使用高频振荡器时间可以适当缩短, 如果使用低频振荡器时间可以适当延长到 20 分钟。）

样品类型	最大输入量
粪便	200 mg
土壤	250 mg
植物/种子	200 mg
液体样品和口腔拭子	250 $\mu$ l
细胞 (悬浮在保护剂中或者 PBS 等等渗透溶液中)	50-100 mg(湿重) ( $10^9$ 细菌, $10^8$ 酵母细胞, $10^7$ 哺乳动物细胞)
保护剂系列的收集套装	750 $\mu$ l

2. 将裂解管离心 1 分钟。
3. 将上述步骤中 400 $\mu$ l 上清加到一个干净的 RNase-free 离心管中。然后进行下面的 RNA 纯化步骤。

### RNA纯化:

以下离心步骤的离心力均在10,000-16,000 x g下离心1分钟, 除非特殊说明。

1. 添加2倍体积的RNA裂解液(~800µl)到管子中混匀。
2. 添加等体积的 95-100%无水乙醇 (~1200µl)到上述溶液中混匀。
3. 将上述混合液添加 3 号柱 G 中，3 号柱 G 套在一个收集管内，离心，去除滤出液。(液体体积超过 800µl 需要反复装填离心)
4. 添加 400µl RNA 预洗液到柱子中，离心。去除滤出液。
5. 添加 400µl RNA 洗涤液到柱子中，离心。将 3 号柱 G 套在一个干净的无 RNase 的离心管中。
6. 直接添加 85µl RNase-free H<sub>2</sub>O 到 3 号柱 G 基质上，离心。丢弃 3 号柱 G。
7. 添加 10µl DNA 消化液和 5µl DNase I 溶液到离心管中，混匀。在室温 (20-30°C) 下孵育 15 分钟。
8. 添加2倍体积的RNA裂解液 (~200µl) 到离心管中混匀。
9. 添加等体积的 95-100%无水乙醇 (~300µl)到上述溶液中中混匀。
10. 将上述混合液添加到一个新的 3 号柱 G 中，3 号柱 G 套在一个收集管内，离心，去除滤出液。
11. 添加 400µl RNA 预洗液到柱子中，离心。去除滤出液。
12. 添加 700µl 的 RNA 洗涤液到柱子里，离心。去除滤出液。
13. 添加 400µl 的 RNA 洗涤液到柱子里离心 2 分钟以完全去除乙醇，以免抑制下游反应。将 3 号柱 G 套在一个干净的无 RNase 的离心管内。
14. 在吸附膜的中间部位加 100µl RNase-free H<sub>2</sub>O 离心。(如要提取到高浓度的 RNA 可以添加 50µl)
15. 将抑制物去除柱套在一个新的收集管内，添加600µl的抑制物去除液，在≥8,000 x g 下离心3分钟。
16. 把洗脱的RNA (步骤14) 放入制备好的抑制物去除柱内，将抑制物去除柱套在一个干净的无RNase的离心管内并在16,000 x g 下离心3分钟，得到的RNA可进行后续试验或放在-80°C 以下保存。