

# 快速 RNA 小量提取试剂盒

使用说明书 (版本号: Ver.1.1.0)

## 产品特点

- ◆ 纯化柱可以纯化来自任何样本的总 RNA(包括 small RNA/micro RNA) ,包括细胞、固体组织、生物液体、环境样本、拭子和 DNA/RNA 保存管中的样品。
- ◆ DNA/RNA 保护剂 (EZShied®) 和蛋白酶 K 是独特的保存以及裂解技术。
- → 提取的高纯度 RNA 可用于后续测序、RT、qPCR等操作。

### 产品货号:

TR1057T (10次) /TR1057 (50次) /TR1058 (200次)



扫描二维码了解更多产品信息

简石生物 • Tel: +86-10-58235289 • https://jianshibio.com

# 目录 Contents

产品组份	1
注意事项	1
12.04-2	
产品特性	2
产品描述	2
操作步骤	
1末1トン鉄	4
◇缓冲液制备	4
◆样品制备	4
◆总 RNA 纯化	
A YOU KINA SHIP	6
附录	7
其他相关产品	9
FAQ 常见问题及解决方法	40
FAQ 市光凹越及群次刀広	10
组件查询	11

## 产品组份

试剂盒组成	TR1057T (10 次)	TR1057 (50 次)	TR1058 (200 次)	保存
RNA 裂解液	10 ml	50 ml	2x100 ml	室温
RNA 预洗液	5 ml	25 ml	100 ml	室温
RNA 洗涤液 (未添加乙醇)	5 ml	24 ml	2x48 ml	室温
无 DNase/RNase 水	1 ml	6 ml	30 ml	室温
DNase I	50 U	250 U	4x250 U	-20°C
DNA 消化液	0.8 ml	4 ml	16 ml	室温
DNA/RNA 保护剂 (2X)	5 ml	25 ml	125 ml	室温
PK 消化液	1 ml	5 ml	20 ml	室温
蛋白酶 K	2x5mg	3x 20mg	9x20mg	-20°C
蛋白酶 K 保存液	2 x500µl	3 x 1.2ml	9 x 1.2ml	-20°C
3号 Y 纯化柱(黄)	10个	50个	200个	室温
3号 CG 纯化柱(绿)	10个	50个	200个	室温
2ml 收集管	20个	100个	400 个	室温

## 注意事项

储存温度: 所有组件均在室温下储存。

#### 使用前:

- RNA 洗涤液在使用之前一定要配好,添加好乙醇后在试剂瓶上做好标记!
   将 96ml 100%乙醇 (104ml 95%乙醇)加入 24mlRNA 洗涤缓冲液 (R1057)
   或 192ml 100%乙醇 (208ml 95%乙醇)加入 48mlRNA 洗涤缓冲液 (R1058)
- 2. 用无 DNase/RNase 水重悬冻干的 DNase I, 混匀后, 冷冻保存: TE1009-A (250 U), 加 275 μl 水 TE1009-A-S (50 U),加 55 μl 水
- 3. 将蛋白酶 K 保存液添加到蛋白酶 K, 20 mg

## 产品特性

- → 样品来源于任何细胞(动物、细菌、血红细胞等)、所有组织(难以裂解、FFPE等)、血液、生物体液、酶反应(如 DNase I 处理过的样本)和 DNA/RNA 保护剂(EZShied®)或其他保护剂保存的样品。
- ← 样本保存和失活: DNA/RNA 保护剂 (EZShied®) 可以裂解细胞,并且失活核酸酶和感染成份(例如病毒,病原体),对于在室温下保存或运输样本是一种理想的选择。
- ◆ 总RNA大小,包括small RNA/microRNA (≥ 17 nt).
- → 产率可达到 100 µg 的 RNA.
- ◇ 洗脱体积 ≥ 50 µl 无 DNase/RNase 水.
- ◇ 所需设备: 微离心机、漩涡震荡仪、水浴锅或培养箱。

## 产品描述

- ◆ 快速 RNA 小量提取试剂盒结合了 RNA 提取技术, DNA/RNA 保护剂 (EZShied®), 独特的 裂解技术以及蛋白酶 K,可以轻松,可靠,快速地从任何生物样品中分离 RNA,包括任何细胞,组织,血液和其他生物液体。
- → 该方法采用独特的离心柱技术,可以获得高质量的总 RNA(包括 17-200nt 的 small RNA),可用于测序、RT/qPCR、杂交等。

# Heta Heta Heta Heta Rain Muscle Heart Heart Heman Porcine E. coli Commentum Alcotiana sp.

#### 可以从任何样品中提取中高质的 RNA

高质量的总 RNA 从包括哺乳动物在内的各种样品中分离出来,包括血、细菌、酵母等

#### 输入量和平均总 RNA 产率

输入量和平均总 RNA 产率			
输入	平均 RNA 产率	上样量	
细胞	10 μg (每 10 <sup>6</sup> cells)	最多 10 <sup>7</sup>	
HeLa	15 µg		
输入	平均 RNA 产率	上样量	
高产量组织	≥ 30 µg (每 10 mg)	最多 20 mg	
脾	30-50 μg		
肝	40-60 μg		
输入	平均 RNA 产率	上样量	
低产量组织	≤ 30 µg (每 10 mg)	最多 50 mg	
大脑、心脏	5-15 μg		
肌肉	5-20 μg		
肺	10-20 μg		
肠	10-30 µg		
肾脏	20-30 μg		
输入	平均 RNA 产率	上样量	
全血	每 1 ml 的产量	最多 3 ml	
猪	10-20 μg		
人	2-10µg		

组织的产量可能因其他因素(即生物样本类型、生理状态和生长条件)而变化。 血液中的产量可根据采集、样品制备、供体年龄/健康程度而变化

## 操作步骤

该流程由三部分组成: (I) 缓冲液制备; (II) 样品制备; (III) RNA 纯化;

#### (1) 缓冲液制备

- RNA 洗涤液在使用之前一定要配好,添加好乙醇后在试剂瓶上做好标记! 将 96ml 100%乙醇 (104ml 95%乙醇) 加入 24mlRNA 洗涤缓冲液,或 192ml 100%乙醇 (208ml 95%乙醇) 加入 48mlRNA 洗涤缓冲液。
- 2. 用无 DNase/RNase 水重悬冻干的 DNase I, 混匀后, 冷冻保存。 TE1009-A (250 U), 添加 275 μl 水 TE1009-A-S (50 U), 添加 55 μl 水

TE1011-A (1500 U), 添加 1,500 µl 水

タケエを力能 V 上を力能 V 伊方法等に

- 3. 将冻干蛋白酶 K 与蛋白酶 K 保存液漩涡混合,配置成 20mg/ml 的溶液。立刻使用或储存。 TD3001-2-60 (60 mg), 添加 3. 12 ml 洗涤液 TD3001-2-5 (5 mg), 添加 0.26 ml 洗涤液
- 4. 向 DNA/RNA 保护剂 (EZShied®) (1:1) 中加入等体积的无 DNase/RNase 水配制 1X 溶液, 搅拌混匀。

#### (II) 样品制备

在室温下进行所有步骤,并在 10000-16000X g 下离心 30 秒,除非特别说明。 样品稳定并保存在 DNA/RNA 保护剂(EZShied®)中(细胞、组织、拭子等) 如果冷冻,在 DNA/RNA 保护剂(EZShied®)中解冻匀浆样品至室温(20-30°C)。根据样品类型进行下面的适当程序。

#### 细胞和组织 (哺乳动物)

- 1. 对于已经储存在 DNA/RNA 保护剂 (EZShied®) 中的样品 (细胞或组织),加入等体积的RNA 裂解液 (1: 1),充分混合并进行纯化。
- 2. <u>细胞</u>:如果在悬浮颗粒中离心 1 分钟(< 500X g),去除上清。将细胞颗粒重新悬浮在 RNA 裂解液中(见下表)。通过离心去除颗粒碎片,将上清液转移到无核酸酶管中。

细胞	加入 RNA 裂解液		
≤ 5x10 <sup>6</sup>	≥ 300 µl		
5x10 <sup>6</sup> - 10 <sup>7</sup>	≥ 600 µl		

3. <u>组织</u>: 将适量的新鲜或冷冻样品(见下表)浸入 DNA/RNA 保护剂(EZShied®)中(1X) 匀浆

组织	加入 DNA/RNA 保护剂 (EZShied®) (1X)		
核酸产量高 (≤ 25 mg)	.000		
核酸产量低(≤ 50 mg)	i ≤600 μl		

a.每 300 μl 样品加入 15μl 蛋白酶 K 和 30 μl PK 消化液, 室温 (20-30℃) 孵育,

- 20-30 分钟(匀浆)或 2-5 小时(未匀浆)。具体样本需要进行调整。
- b.为了去除沉淀等杂质, 离心并将上清液转移到无核酸酶管中。
- c.在上清液中加入等量的 RNA 裂解液 (1:1) 混合均匀。
- 4. 如果液体/介质不能去除,将≥3倍体积的 RNA 裂解液加入 1体积的液体样品中 (3: 1),混合均匀。
- 5. 样品类型输入和平均产量的例子见第3页的图表。
- 6. DNA/RNA 保护剂 (EZShied®) 溶液为 1 倍
- 7. 为了提高匀质效果,使用裂解管单独裂解样品。其他类型的匀质化可以包括臼/杵、注射器或组织研磨仪等,组织样品可以仅用蛋白酶 K 处理

#### 难裂解样品(细菌、酵母、昆虫、拭子、土壤粪便、植物、种子)

1. 将适量的样品加入到 800 µl 的 DNA/RNA 保护剂 (EZShied®),并匀质。

			, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
坚硬的组织	微生物		DNA/RNA 保护剂 (EZShied®)
植物/种子或昆虫 (≤ 200 mg)	细菌(≤10 <sup>9</sup> ) 酵母(≤10 <sup>8</sup> ) 粪便/土壤(≤	50 mg)	800µl

- 2. 匀质后,以最大转速离心去除颗粒碎片,将上清液转移到无核酸酶管中
- 3. 将等体积的 RNA 裂解液加入上样液中,混合均匀后继续纯化。

#### FFPE 组织

- 1. 从≤25mg FFPE 组织中去除多余的石蜡,并转移到无核酸酶管中
- 2. 向样品中加入 400µl 脱胶液。55°孵育 1 分钟。涡旋,去除脱胶液
- 3. 加入 95µl 无 DNase/RNase 水, 95µl (2X) 溶出洗涤液, 10µl 蛋白酶 K 混合均匀。
- 55℃解音 1 小时、然后 65℃解音 15 分钟防止样品交联。
- 5. 离心去除不溶性碎片,将 200µl 上清液转移到无核酸酶管中
- 6. 在上清液中加入 RNA 裂解液 (1:1) 混合均匀。

#### 血液细胞 (哺乳动物、淋巴细胞。白细胞等)

对于血细胞,血黄层沉淀和用 PAXgene® 或 RNAlater™沉淀的细胞,用 1X的 DNA/RNA保护剂(EZShied®)中重悬。

血细胞	添加 DNA/RNA 保护剂 (EZShied®)	
≤ 5 ml 血液 (≤ 10 <sup>7</sup> cells)	≥ 300 µl	

- 2. 每 300µl 样品加入 15µl 蛋白酶 K 和 30µlPK 消化液
- 3. 混合后室温 (20-30℃) 孵育 20-30 分钟。可能需要进行调整。
- 4. 孵育后,涡旋样品并以最大速度离心 2 分钟来沉淀颗粒。将 300µl 清除后的上清液转移到无核酸酶管中。

5. 在上清液中加入 RNA 裂解液 (1: 1), 混合均匀。

#### 全血 (哺乳动物)

- 将 200μl DNA/RNA 保护剂 (2X) (EZShied®) 直接加入每 200μl 新鲜或冷冻血液样品中,充分混合。
- 每 400µl 保护剂/血液混合液,加入蛋白酶 K 8µl ,混合均匀。室温 (20-30℃) 孵育 30 分钟。
- 3. 孵育后,涡旋样品并以最大速度离心 2 分钟来沉淀颗粒,将上清液转移到新的无核酸酶管中。
- 4. 加入等体积的异丙醇 (1:1),混合均匀。
- 5. 将混合物转移到收集管中的 3 号 CG 纯化柱(绿)中,离心,丢弃废液并进行纯化。

#### 唾液和口腔细胞

1. 对于唾液和口腔细胞样本,加入等体积的 DNA/RNA 保存液(2 倍体积浓缩)(1: 1)

<b>唾液和口腔细胞</b>	添加 DNA/RNA 保护剂 (EZShied®)	
200 µl (≤ 10 <sup>7</sup> 细胞)	200 μΙ	

- 2. 每 400µl 试剂/样品混合物,加入 20µl 蛋白酶 K和 40µl PK 溶出洗涤液
- 3. 混合并在室温(20-30℃)下孵育大于等于30分钟。可能视情况调整。
- 4. 涡旋后,涡旋样品以最大速度离心 2 分钟来沉淀颗粒。将 400μl 上清液转移到无核酸酶管中。
- 5. 在上清液中加入 RNA 裂解液 (1: 1),混合均匀。

#### 尿液

1. 在最多 40ml 尿液中加入 70μl 尿液调节洗涤液。保证每毫升尿液中都存在颗粒状细胞, 3000x g 离心 15 分钟, 弃掉上清, 保留颗粒,添加 DNA/RNA 保护剂 (1X) (EZShied®),并混匀。

从尿液中提取颗粒状细胞	添加 DNA/RNA 保护剂 (1X) (EZShied®)
≤ 40 ml 尿液	300 µl

- 2. 每 300 µl 样品加入 15µl 蛋白酶 K
- 3. 室温 (20-30℃), 孵育≥30分钟, 时间可以进行调整。
- 4. 孵育后,涡旋样品以最大速度离心 2 分钟来沉淀颗粒,将 300μl 上清液转移到无核酸酶管中。
- 5. 在上清液中加入 RNA 裂解液 (1:1),混合均匀。

#### (III) 总 RNA 纯化

在室温下进行所有步骤, 并以 10000-16000 X g 离心 30 秒。

1. 将在 RNA 裂解液中裂解的样品转移到 3 号 Y 纯化柱(黄),在收集管和离心机中去除大部分 基因组 DNA。

保存过滤液加入 1 倍体积的乙醇加到上述的过滤液中(1:1),搅拌均匀。

- 2. 将混合液转移到新的收集管(绿色)中并离心,丢弃过滤液。
- 3. DNase I 处理
- (D1) 用 400µl RNA 洗涤液洗涤纯化柱,离心,丢弃过滤液。
- (D2) 在无核酸酶管中,加入 5μl DNase I (1U/μl), 75μl DNA 消化液混合,将混合液直接加入纯化柱中。
- (D3) 将纯化柱室温 (20-30°C) 孵育 15 分钟。
- 4. 向纯化柱中加入 400 µl 预洗液并离心, 弃掉过滤液。
- 5. 在纯化柱上加入 700µl RNA 洗涤液, 离心, 弃掉过滤液。
- 6. 加入 400μl RNA 洗涤液,离心 1 分钟,确保洗涤液完全去除,然后将纯化柱转移到无核酸酶管中
- 7. 将 100 µl 无 DNase/RNase 水直接加入纯化柱中并离心,对于高浓度的 RNA,使用 250 µl 洗脱。洗脱后的 RNA 可立即使用或冷冻保存。

## 附录

#### 保存在 DNA/RNA 保护剂 (EZShied®) 中的样本。

- ◆ 液体样品(如全血): 加入 3 倍体积 DNA/RNA 保护剂(1X) (EZShied®) 到 1 体积的样品(3: 1) 混合均匀。
- ◆ 固体样品(如组织): 将样品(不超过 10%) 浸泡在 DNA/RNA 保护剂(EZShied®)中并匀 质
- ♦ 将样品在 DNA/RNA 保护剂 (EZShied®) 中常温保存≥1 个月或在冷冻温度下长期保存。 DNA/RNA 保护剂 (EZShied®) 与大多数基于胍盐的提取方法直接兼容。例如,在提取之前不需要从保护剂保存的样品中去除试剂。

#### 保存在其他 RNA 保护剂或 PBS 生理盐水中的样品

- ◆ RNAProtect®, Allprotect®:在 1 体积的液体样品中加入 3 体积的 RNA 裂解液,充分混匀或根据样品类型匀质。然后进行总 RNA 纯化。
- ♦ RNAlater™:
  - a.细胞-在5000xg离心并除去上清液。
  - b.组织-用镊子转移到新管中并移除所有的 RNAlater™。
  - 或者,对于无法去除 RNAlater™的液体样品,在 1 倍体积的液体样品中加入 1 体积的乙醇
- ◆ PAXgene®: 请参阅制造商的说明, 去除试剂, 然后进行样品制备。
- 种 UTM®/VTM®/生理盐水或 PBS 保存的拭子样品:除去拭子,在 1 体积样品中加入 3 倍体积的 RNA 裂解液 (1:3)。将每 200μl 的混合物混合并转移到无核酸酶管中,继续进行总RNA 纯化。

#### 液体/各种反应纯化(如 DNase I 处理 RNA,体外转录等)

将 150µIRNA 裂解液加入到 50µI 液体样品中 (3:1),混合均匀,进行纯化。

#### 蛋白质纯化: 丙酮沉淀蛋白质

RNA 与纯化柱结合后,可以纯化滤出液中的蛋白质含量(变性):

- 1. 加入 4 倍体积的丙酮 (-20℃) 以 4: 1 的比例到入滤出液中并混匀。
- 将样品在冰上孵育 30 分钟 2.
- 3. 以最大速度离心 10 分钟。丢弃上清。保留沉淀。
- 向蛋白质沉淀中加入 400µl 乙醇(95-100%),以最大转速离心 1 分钟。丢弃上清。 4.
- 将蛋白质沉淀在室温下风干 10 分钟 5.
- 6. 用合适的溶液重悬并离心沉淀,得到的蛋白适合下游应用实验(如 SDS-PAGE)

#### 裂解管中匀质的样品

- 推荐用于难裂解样品的完整性高效匀质(如组织、植物、种子、微生物等)
- 对于高速匀质机和低速匀质机,可能需要调整裂解时间。

	组织		微生物
输入	哺乳动物 植物/种子或昆虫		细菌、沼泽、酵
			母、粪便/土壤
目录编号	TS6003	TS6003(2.0 mm)	TS6012(0.5 mm
(裂解珠尺寸)	(2.0 mm)	130003(2.011111)	and 0.1 mm)
高速	30-60 sec	3-5 min	30-60 sec
低速	3-5 min	15-20 min	5-10 min

#### 通过不同的体系可以分离到小片段 RNA 和大片段 RNA

该步骤适用于动物细胞输入量(≤10°)或纯化的 RNA,在室温下操作所有步骤,在 10000-16000x g 离心 30 秒,除非特殊说明。

- 1. 将等体积的 RNA 裂解液和乙醇(95-100%)(1:1)混合。例如:将 50ul 洗涤液与 50ul 乙醇混匀。
- 将上述步骤 1 中的混合物按照 2 倍体积添加到样品中并混合。例如:将步骤 1 中 100ul 混合 2. 液添加到 50ul 样品混合。
- 将步骤 2 混合物转移到纯化柱上离心,保留过滤液。 3.
- 4. 小片段 RNA (17-200 nt) 在过滤液中。

·大片段 RNA (>200 nt) 保留在纯化柱中

a. 按照(III) 总 RNA 纯化操作步骤 4 继续操作。

a. 加入 1 倍体积乙醇混合

例如: 向 150µl 过滤液中加入 150µl 乙醇。

b.将混合物转移到新的纯化柱并进行离心。

#### 弃掉讨滤液

c. 按照(Ⅲ) 总 RNA 纯化操作步骤 4 继续操作。

# 其他相关产品

✓ 对于难以裂解的样品,使用我公司裂解管

裂解柱	
2.0 mm beads #TS6003	植物/动物组织
0.1 + 0.5 mm beads #TS6012	微生物
0.1 + 2.0 mm beads #TS6014	组织中的微生物/昆虫

✓ 用于从各种样品中提取 DNA/RNA

小量 DNA/RNA 提取试剂盒	
Microprep Plus #TD7005	低至1个细胞
MagBeads #TR2130	可兼容的自动化设备(Tecan, Hamilton, Kingfisher, etc.)

✓ 对于任何 RNA 样品的纯化和浓缩。例如(从 trizol 萃取物中的水相中)或者从任何酶促反应中(例如,DNasel 处理的 RNA)

RNA 纯化浓缩试剂盒	
Microprep #TR113	包含 DNasel 组件
MagBeads #TR1082	可兼容的自动化设备 (Tecan, Hamilton, Kingfisher, etc.)

✓ 对于建库

RNA 建库试剂盒	
#R3000	12 preps
#R3003	96 preps

# FAQ 常见问题及解决方法

FAQ 常见问题及解决方法					
Q: 问题	A,: 可能的原因和建议的解决方案				
沉淀,粘性裂 解物	不完全裂解或高含量样品:如果发生沉淀(在裂解物中加入乙醇后)或裂解物非常粘连,请增加 DNA/RNA 保护剂(EZShied®)或 RNA 裂解液的体积,以确保完全裂解和匀质,直到裂解物清澈透亮。				
低纯度 (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> nm,A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> nm)	样品处理: 乙醇或盐污染,离心步骤完成后,小心地将纯化柱从收集管中取出,以防止洗涤液残留。或者,可用纸巾或毛巾吸干空的收集管。确保裂解液和洗涤液已完全通过纯化柱的基质。这可能需要以更高的速度或更长的时间离心。 不完全裂解/或细胞碎片: 添加 DNA/RNA 保存管或 RNA 裂解液的体积(按照比例),以确保完全裂解和匀质化,确保离心并使任何的细胞碎片成团,然后处理残留的裂解物。				
低含量	样品投入量: 投入过多或裂解不完全会导致细胞碎片堵塞或使纯化柱过载,导致核酸回收率低。使用较少的样品或增加 DNA/RNA 保护剂(EZShied®)的体积或 RNA 裂解液。 高蛋白含量样品(血液/血浆): 在纯化前对样品进行蛋白酶 K 处理。				
DNA 污染	去除 DNA: 进行柱内 DNasel 处理或进行 DNasel 处理后纯化,然后重新纯化处理过的样品。 对于未制备的样品。增加 DNA/RNA 保护剂(EZShied®)或 RNA 裂解液的体积以确保样品的完全裂解和匀质。				
RNA 降解	防止 RNA 降解: 立即收集和裂解新鲜样品到 DNA/RNA 保护剂(EZShied®)中或 RNA 裂解液确保 稳定性。匀质后的样品可冷冻保存,以备后期处理				

# 组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
RNA 裂解液	TR1060-1-10	10 ml	
	TR1060-1-50	50 ml	室温
	TR1060-1-100	100 ml	
RNA 预洗液	TR1060-2-5	5 ml	
	TR1060-2-25	25 ml	室温
	TR1060-2-100	100 ml	
RNA 洗涤液 (未添加乙醇)	TR1003-3-5	5 ml	
	TR1003-3-24	24ml	室温
(不冰加口母)	TR1003-3-48	48ml	
	TW1001-1	1 ml	
无 DNase/RNase 水	TW1001-6	6 ml	室温
	TW1001-30	30 ml	
DNase I	TE1009-A-S	50 U	20%5
	TE1009-A	250 U	-20°C
DNA 消化液	TE1010-1-1	1 ml	
	TE1010-1-4	4 ml	室温
	TE1010-1-16	16 ml	
	TR120-5	5 ml	
DNA/RNA 保护剂 (2X)	TR120-25	25 ml	室温
	TR120-125	125 ml	
PK 消化液	TR1200-1-1	1 ml	
	TR1200-1-5	5 ml	室温
	TR1200-1-20	20 ml	
蛋白酶 K	TD3001-2-A	5 mg	20%
	TD3001-2-B	20mg	-20°C
蛋白酶 K 保存液	TD3001-2-C	500µl	-20°C
	TD3001-2-D	1.2ml	-20 C

3号Y纯化柱(黄)	TC1006-10-F	10个	- 室温
	TC1006-50-F	50个	
3号 CG 纯化柱(绿)	TC1006-10-G	10个	- 室温
	TC1006-50-G	50个	
2ml 收集管	TC1001-20	20个	
	TC1001-50	50个	室温
	TC1001-200	200个	