

## 产品组成

Trizol柱纯化总RNA试剂盒 Cat. No.	5次样品 A-5003005	50次制备 A-5003050
核酸纯化柱	5个	50个
2 ml离心管	5个	50个
Trizol试剂	6 ml	55 ml
Buffer WA (浓缩液)	1.9 ml (需加无水乙醇2.5ml)	12 ml (需加无水乙醇16ml)
Buffer WBR (浓缩液)	1.5 ml (需加无水乙醇3.6ml)	9.5 ml (需加无水乙醇22.5ml)
RNase-Free Water	1.5 ml	2 ml×3
研磨棒	5根	50根
说明书	1份	1份

A&DPure Trizol+纯化柱总RNA试剂盒 Cat. No.	5次样品 A-5013005	50次制备 A-5013050
核酸纯化柱	5个	50个
2 ml离心管	5个	50个
Trizol试剂	6 ml	55 ml
Buffer RDD	250 µl	2.5 ml
DNase I	28 µl	270 µl
Buffer WA (浓缩液)	3.8 ml (需加无水乙醇5 ml)	24 ml (需加无水乙醇32 ml)
Buffer WBR (浓缩液)	1.5 ml (需加无水乙醇3.5 ml)	9.5 ml (需加无水乙醇22.5 ml)
RNase-Free Water	1.5 ml	2 ml×3
研磨棒	5根	50根
说明书	1份	1份

## 产品储存与有效期

DNase I 请置于-20℃贮存，Trizol 试剂请置于 2~8℃贮存。

其他物品和试剂如果储存于室温（15~25℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上。

## 用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇、70%乙醇（DEPC处理的水配制）、氯仿
2. 1.5ml离心管（必须选用RNase-free的1.5 ml离心管）
3. 移液器吸头（为避免RNA酶的污染，请选用含有滤芯的RNase-free移液器吸头）
4. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心1.5ml离心管和2 ml离心管的转子）
6. 旋涡震荡器

7. 不使用RNA酶的RNA提取专用实验室

8. 可能需要液氮及研钵

## 技术支持

艾德科技（北京）有限公司研发部：e-mail: [tech@aderr.com](mailto:tech@aderr.com) 电话：010-57225208。

## 质量保证

艾德科技（北京）有限公司保证所提供的产品是通过质量检验的合格产品。如果用户在使用中发现产品不能满足实验要求，请立即停止使用产品，并联络我公司技术支持获取帮助；或者直接联络我公司当地代理商，提出产品更换要求。根据我们以往的经验，用户使用的样本差异是导致结果差异的最主要原因，如果需从一些罕见的样本中分离纯化RNA，请务必与我们的技术支持沟通后再进行实验操作。

## 产品介绍

Trizol试剂是即用型细胞和组织总RNA提取试剂。在匀质化或溶解的样本中，Trizol试剂可保持RNA的完整性，同时能破坏细胞并溶解细胞组分。加入氯仿离心后，裂解液分离成水相和有机相。RNA存在于水相中，在含有RNA的水相中补加乙醇后加入核酸纯化柱，RNA结合在核酸纯化柱上，残留的蛋白与PCR抑制物则被过滤除去，RNA经Buffer WA和Buffer WBR洗涤后，用RNase-Free Water洗脱，即可用于各种分子生物学实验。通过Trizol试剂与柱纯化技术的完美结合，本试剂盒无需异丙醇沉淀及乙醇洗涤步骤，整个过程可在30-60分钟内完成。与经典的Trizol沉淀法相比，本试剂盒获得的总RNA盐分、蛋白残留更低，可直接用于Northern blot分析、斑点杂交、poly(A)+选择、体外翻译、RNA酶保护分析和分子克隆等实验。

## 防止RNA酶污染的注意事项

由于RNA酶的活性难以抑制，进行RNA工作时，必须遵守以下注意事项：

(1) 提取RNA的实验室必须有专用的单独实验室，并且RNA专用实验室要和经常使用RNA酶的实验室离得越远越好。

(2) RNA实验全过程必须戴着手套、口罩及专用实验服。皮肤上通常包含的细菌和霉菌，可污染RNA的制备，同时也是RNA酶的一个来源。良好的微生物操作技术可防止微生物污染。

(3) 使用无RNA酶的制品。必须采购标有“RNase-free”字样的离心管、移液器吸头（推荐带滤芯吸头）用于RNA提取；如果离心管或移液器吸头无“RNase-free”标识，则在使用前必须经过0.1% DEPC水，37℃过夜浸泡，并灭菌处理。RNA操作的所有设备、仪器均不应与其他实验室混用，特别是要绝对禁止与经常使用RNase的实验室混用。

(4) 当Trizol试剂的存在时，RNA酶处于失活状态。但是柱纯化操作步骤中所涉及的试剂均需用RNase-free的水配制（DEPC处理水的配制方法：

在去离子水中加入0.1%的DEPC，37℃过夜孵育后灭菌处理。也可直接购买Simgen的DEPC水（产品序号9003100、9003500）配制实验所需的70%乙醇）。

（5）提取RNA必须使用新鲜获取的样本；或者将新鲜采集的样本及时置于-70℃以下贮存。样本前处理时必须低温下操作，比如液氮研磨样本；或者在加入变性剂（如Trizol等）的条件下常温研磨样本。

## 其他需要注意的事项

### 警告！

**Trizol试剂含有苯酚和胍盐成分，与皮肤接触会导致烧伤，如果不慎与皮肤接触，应立即用洗涤剂和大量清水冲洗。Trizol试剂与Buffer WA吞咽有毒，如不慎误食，应就近及时治疗。**

当使用 Trizol 试剂工作时，应使用手套、口罩，并保护眼睛（屏蔽、安全护目镜）。避免与皮肤或衣服接触。使用化学通风橱，避免吸入蒸气。

## 产品适用的样本范围

本产品可完美应用于各种人类、动物、植物或细菌来源的组织和细胞中分离纯化总RNA。适用的起始样本如下表：

样本	推荐用量
动物组织（肝脏、脑等易处理组织）	10-100 mg
动物组织（皮肤、骨头等易处理组织）	25-200mg
血液（红细胞有核生物）	200 $\mu$ l
血液（红细胞无核生物）	100-500 $\mu$ l
培养细胞	5-10 $\times$ 10 <sup>6</sup>
真菌	10-100 mg
细菌	10-100 mg
植物组织	10-100 mg

## 操作步骤分析与说明

### 1. 样本RNA的释放

对于易处理样本的前处理只需加入 1ml 的 Trizol 试剂，用移液器吹打即可释放 RNA，如培养细胞、全血等；对于容易匀浆样本（比如肌肉组织、肝脏组织等）的前处理，可加入 500 $\mu$ l Trizol 试剂至含样本的 1.5ml 离心管中，用研磨棒研磨至无明显颗粒状；对于难以匀浆的样本，则需在含样本的研钵中加液氮研磨至面粉状后再加入 Trizol 释放 RNA，比如骨头组织、皮肤组织等。

## 2. 柱纯化技术

### 1) RNA 结合

在含有 RNA 的水相中补加同体积的 70% 乙醇后加入纯化柱中短时离心数十秒, 即可使 RNA 吸附到纯化柱的硅胶膜上, PCR 抑制物或者抑制下游分子生物学反应的杂质则被过滤除去。

### 2) 洗涤

纯化柱上通常会残留少量蛋白, Buffer WA 能有效地洗去这些残留的蛋白。

Buffer WBR 会洗去残留在膜上的 Buffer WA, 确保纯净的 RNA 吸附在纯化柱上。

RNA 结合、洗涤的过程中只需要使溶液滤过纯化柱即可, 因此对离心速度和离心时间并无严格的要求, 可以选用离心机中的“short run”模式运行以节约操作时间。

### 3) 离心甩干

将洗净后的纯化柱放回到 2 ml 离心管中, 14000 rpm 离心 1 分钟 (如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm, 我们建议至少使用 12000-13000 rpm 离心 2 分钟。)的作用:

A. 使 Buffer WBR 被充分地离心除去。

B. 在丢弃 Buffer WBR 滤液的过程中, 如果有滤液不慎沾染到纯化柱底部, 也可被离心除去。

### 4) 洗脱 RNA

A. 我们推荐使用试剂盒中提供的 RNase-Free Water 洗脱 RNA。

B. 预热的 RNase-Free Water 能提高 RNA 的洗脱效率。

C. 将 RNase-Free Water 加入纯化柱后延长静置的时间 (延长至 3-5 分钟) 能提高 RNA 的洗脱效率。

D. 离心甩干后的纯化柱可直接加入 RNase-Free Water 洗脱 RNA, 无需打开纯化柱盖子挥发残留的乙醇, 过度干燥的纯化柱会不利于 RNA 的洗脱。

E. 洗脱的 RNA 片段在 200bp-10kb 之间, 主要的 RNA 是核糖体 RNA。

F. 出于产品使用安全的考虑, 如果离心机没有防泄漏的盖子, 我们建议在洗脱 RNA 的时候将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟, 以避免 1.5 ml 离心管管盖脱落。

## 4. 柱上消化 DNA

Trizol 试剂在萃取的过程中可去除大部分的 DNA, 如果选购的 cDNA 试剂盒已经含有 DNase I 消化步骤 (比如 A&D cDNA 第一链合成试剂盒, Cat. No. A-7306025/7306100), 则无需进行 DNase I 柱上消化。但是对于一些敏感的下流实验, 必须要去除微量的 DNA 残留的情况下, 可选择进行柱上消化 DNA 的步骤, 具体如下:

将“弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入 500  $\mu$ l Buffer WA, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。”步骤替换成以下步骤:

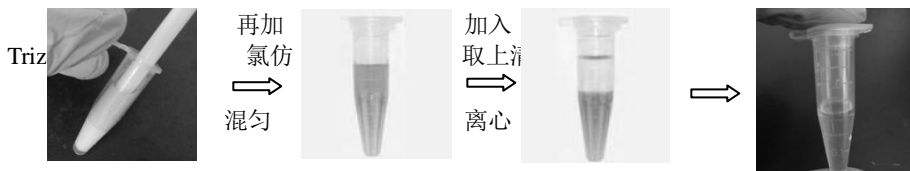
1) 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 在核酸纯

纯化柱中加入500  $\mu$ l Buffer WA, 盖上管盖, 12000 rpm 离心30秒。丢弃2ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中。

2) 取5  $\mu$ l DNase I 加入到一个洁净的1.5 ml离心管管底, 再加入45  $\mu$ l Buffer RDD, 勿弃吸头, 直接用移液器温和地吹打几次混合均匀, 将混合液全部加入纯化柱的膜中央, 室温静置(20–30 $^{\circ}$ C)15分钟。

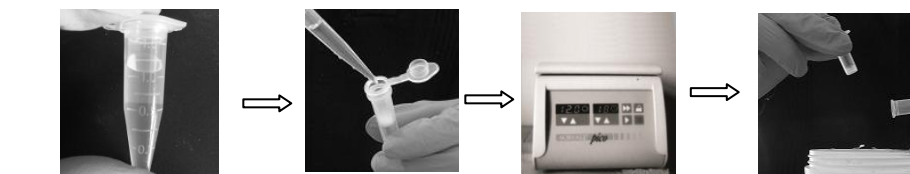
3) 加入500  $\mu$ l Buffer WA, 盖上管盖, 13000 rpm 离心1分钟。

操作流程图示



再加氯仿混匀

加入取上清离心

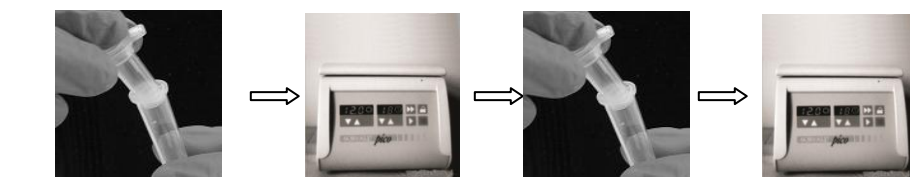


离心结合RNA

丢弃滤液

置回纯化柱

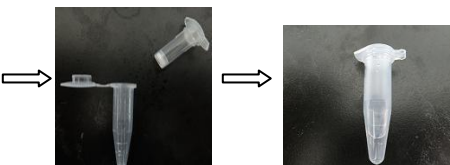
Buffer WA、WBR置回纯化柱洗涤



离心甩干

放入1.5 ml离心管

离心洗脱RNA



丢弃纯化柱

纯净的RNA

## 使用前准备

- 1) 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
- 2) 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。
- 3) 因为唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，所以 RNA 的提取的全过程都需要戴乳胶手套和口罩。

## 从易匀浆的人或动物组织中（肌肉、肝脏及脑等组织）分离纯化总 RNA

1) 用预冷过的 1.5 ml 离心管称取 50-100mg 人或动物组织，加入 500  $\mu$ l Trizol 试剂。用研磨棒研磨至无明显颗粒，再加入 500  $\mu$ l Trizol 试剂混匀。

\* 尽量在组织尚未融化前加入 Trizol 试剂，以减少组织内源性的 RNA 酶对 RNA 的降解。

\* 可选步骤：如样品中含有较多蛋白质、脂肪、多糖或胞外物质（肌肉部分等）可于 12000 rpm 离心 5 分钟，取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织时，上层有大量油脂应去除。取澄清的匀浆液进行下一步操作。

2) 加入 200  $\mu$ l 氯仿，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。

3) 吸取上层水相转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入等体积的 70% 乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注两次混匀，进入步骤 4) 的操作。

4) 吸取 600  $\mu$ l 混合液转移到核酸纯化柱（核酸纯化柱置于 2ml 离心管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

5) 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，将 1.5 ml 离心管中剩余的液体全部倒入核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

\* 如需柱上消化 DNA，请参考第 4 页“4. 柱上消化 DNA”替换步骤 6) 的内容。

6) 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500  $\mu$ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7) 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 600  $\mu$ l Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8) 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

\* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。



\* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9) 弃2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个RNase-free的1.5 ml离心管中，在纯化柱中加入50  $\mu$ l RNase-Free Water，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm 离心30秒。

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000rpm离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10) 弃纯化柱，洗脱的RNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将RNA储存于-70℃以下备用。

## 从培养的动物细胞中分离纯化总 RNA

贴壁培养的细胞样本请按步骤 1a 操作；悬浮培养的细胞样本请按步骤 1b 操作。

1a. 每10cm<sup>2</sup>培养细胞中加入1ml Trizol试剂（比如直径为3.5 cm细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入1ml Trizol试剂），勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，吸取匀浆液转移到一个1.5 ml 离心管中，进入步骤2)的操作。

1b. 用1.5 ml离心管离心收集5-10 $\times$ 10<sup>6</sup>细胞，加100  $\mu$ l PBS溶液，漩涡振荡直至细胞全部悬浮，加入1ml Trizol试剂，勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，进入步骤2)的操作。

\* 可选步骤：如样品中含有较多蛋白质、脂肪、多糖或胞外物质可于12000 rpm离心5分钟，取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量DNA，上清中含有RNA。取澄清的匀浆液进行下一步操作。

2) 加入200  $\mu$ l氯仿，盖上管盖，用力摇晃15秒，12000 rpm离心 15 分钟。

3) 吸取上层水相转移到一个洁净的1.5 ml 离心管中，加入等体积的70%乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注两次混匀，进入步骤4)的操作。

4) 吸取600  $\mu$ l混合液转移到核酸纯化柱（核酸纯化柱置于2ml离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

5) 弃2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml 离心管中，将1.5 ml 离心管中剩余的液体全部倒入核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

\* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

\* 如需柱上消化DNA，请参考第4页“4. 柱上消化DNA”替换步骤6) 的内容。

6) 弃2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入500  $\mu$ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

\* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

7) 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml离心管中，在核酸纯化柱中加入600  $\mu$ l Buffer WBR，盖上管盖，12000rpm离心30秒。

\* 确认在Buffer WBR中已经加入无水乙醇。

8) 弃2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，14000 rpm 离心1分钟。

\* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

\* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

**9) 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 50  $\mu$ l RNase-Free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。**

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000rpm离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

**10) 弃纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于-70℃以下备用。**

## 从植物组织 / 植物细胞 / 酵母 / 细菌中分离纯化总 RNA

**1) 在研钵中用液氮将约 300-500 mg 样品研磨至粉末状，再用液氮预冷的 1.5 ml 离心管称取约 100 mg 研磨成粉末状的组织，加入 1ml Trizol 试剂，勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，进入步骤 2) 的操作。**

\*可选步骤：如样品中含有较多蛋白质、脂肪、多糖或胞外物质（植物结节部分等）可于 12000 rpm 离心 5 分钟，取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织时，上层有大量油脂应去除。取澄清的匀浆液进行下一步操作。

**2) 加入 200  $\mu$ l 氯仿，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。**

**3) 吸取上层水相转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入等体积的 70% 乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注两次混匀，进入步骤 5) 的操作。**

**4) 吸取 600  $\mu$ l 混合液转移到核酸纯化柱（核酸纯化柱置于 2ml 离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

**5) 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，将 1.5 ml 离心管中剩余的液体全部倒入核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

\* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

**\*如需柱上消化DNA，请参考第4页“4. 柱上消化DNA”替换步骤6) 的内容。**

**6) 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500  $\mu$ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

\* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

**7) 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 600  $\mu$ l Buffer WBR，盖上管盖，12000rpm 离心 30 秒。**

\* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

**8) 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。**

\* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

\* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。



9) 弃 2 ml 离心管, 将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中, 在纯化柱中加入 50  $\mu$ l RNase-Free Water, 盖上管盖, 室温静置 1 分钟, 12000 rpm 离心 30 秒。

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子, 请将离心条件改为8000rpm离心1分钟, 以免管盖脱落而损伤离心机。

10) 弃纯化柱, 洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验; 或者将 RNA 储存于-70 $^{\circ}$ C 备用。

## 从全血中分离纯化总 RNA

*无核红细胞抗凝全血、唾液或骨髓样本请按步骤 1a 操作;*

*有核红细胞抗凝全血样本请按步骤 1b 操作。*

1a. 加入 1.2ml 红细胞裂解液到离心管管底, 再加入 300  $\mu$ l 抗凝全血, 盖上管盖后颠倒混合均匀, 室温静置 5min, 3000rpm 离心 5min, 弃上清, 保留管底白细胞沉淀, 加入 1ml Trizol 试剂, 勿弃吸头, 直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解, 进入步骤 2) 的操作。

\* 如果抗凝全血的体积有浮动, 请按比例增减红细胞裂解液, 其它条件不变。

\* 红细胞裂解液:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8.02g,  $\text{NaHCO}_3$  0.84g, EDTA 0.37g溶于1L水中; 或者直接购买A&D红细胞裂解液 Cat. No.: A-9000500。

1b. 取200  $\mu$ l全血到离心管中, 加入1ml Trizol试剂, 勿弃吸头, 直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解, 进入步骤 2) 的操作。

2) 加入 200  $\mu$ l 氯仿, 盖上管盖, 用力摇晃 15 秒, 12000 rpm 离心 15 分钟。

3) 吸取上层水相转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中, 加入等体积的 70%乙醇, 勿弃吸头, 直接用吸头吸注两次混匀, 进入步骤 4) 的操作。

4) 吸取 600  $\mu$ l 混合液转移到核酸纯化柱 (核酸纯化柱置于 2ml 离心管) 中, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。

5) 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 将 1.5 ml 离心管中剩余的液体全部倒入核酸纯化柱中, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。

\* 滤液无须彻底弃尽, 如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染, 可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

***\*如需柱上消化DNA, 请参考第4页“4.柱上消化DNA”替换步骤6) 的内容。***

6) 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入 500  $\mu$ l Buffer WA, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。

\* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

7) 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入 600  $\mu$ l Buffer WBR, 盖上管盖, 12000rpm 离心 30 秒。

\* 确认在Buffer WBR中已经加入无水乙醇。

8) 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中, 14000 rpm 离心 1 分钟。

\* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm, 则用最高速离心2分钟。

\* 请勿省略该步骤, 否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9) 弃 2 ml 离心管, 将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中, 在纯化柱中加入 50  $\mu$ l RNase-Free Water, 盖上管盖, 室温静置 1 分钟, 12000 rpm 离心 30 秒。

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子, 请将离心条件改为8000rpm离心1分钟, 以免管盖脱落而损伤离心机。

10) 弃纯化柱, 洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验; 或者将 RNA 储存于 -70 $^{\circ}$ C 备用。

## 从人或动物的骨头、结缔组织（皮肤等）中分离纯化总 RNA

1) 先将骨头用锤子敲碎或将组织切碎, 称取300-500 mg碎片并转入研钵中, 在研钵中用液氮将样本碎片研磨至粉末状, 用液氮预冷过的1.5ml离心管称取100-200mg粉末, 加入1ml Trizol试剂继续研磨30s。

\* 尽量在骨头粉末尚未融化前加入Trizol试剂, 以减少组织内源性的RNA酶对RNA的降解。

\* 如果骨头样品较少( $\leq 100$  mg)且不易分散, 可先在研钵中加液氮将骨头研磨成粉末状, 然后直接加1ml Trizol试剂至研钵中, 再继续研磨约30秒使研钵中的骨头溶解到Trizol试剂中, 吸取匀浆液至一个1.5 ml 离心管中, 进入步骤2) 的操作。

2) 加入200  $\mu$ l氯仿, 盖上管盖, 用力摇晃15秒, 12000 rpm离心15分钟。

3) 吸取上层水相转移到一个洁净的1.5 ml 离心管中, 加入等体积的70%乙醇, 勿弃吸头, 直接用吸头吸注两次混匀, 进入步骤5) 的操作。

4) 吸取600  $\mu$ l混合液转移到核酸纯化柱(核酸纯化柱置于2ml 离心管中)中, 盖上管盖, 12000 rpm 离心30秒。

5) 弃2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2 ml 离心管中, 将1.5 ml 离心管中剩余的液体全部倒入核酸纯化柱中, 盖上管盖, 12000 rpm 离心30秒。

\* 滤液无须彻底弃尽, 如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染, 可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

**\* 如需柱上消化DNA, 请参考第4页“4. 柱上消化DNA”替换步骤6) 的内容。**

6) 弃2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2 ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入500  $\mu$ l Buffer WA, 盖上管盖, 12000 rpm 离心30秒。

\* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

7) 弃2 ml离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2ml离心管中, 在核酸纯化柱中加入600  $\mu$ l Buffer WBR, 盖上管盖, 12000rpm离心30秒。

\* 确认在Buffer WBR中已经加入无水乙醇。

8) 弃2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中, 14000 rpm 离心1分钟。

\* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm, 则用最高速离心2分钟。

\* 请勿省略该步骤, 否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

**9) 弃2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个RNase-free的1.5 ml离心管中，在纯化柱中加入50  $\mu$ l RNase-Free Water，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm 离心30秒。**

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000rpm离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

**10) 弃纯化柱，洗脱的RNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将RNA储存于-70℃备用。**

## 常见问题分析

### 1、RNA降解

A. 新鲜组织：某些富含内源核酸酶的样品(如肝脏，胸腺等)，不可直接匀浆，应在加入部分trizol试剂的条件下用研磨棒将组织研碎。

B. 样本贮存：组织样本取材后应立即置于液氮中速冻，然后移至-70℃冰箱保存；细胞样本应在收集后直接加入1 ml Trizol试剂，然后移至-70℃冰箱保存。

C. 外源RNA酶的污染：试剂，器械及实验环境中的RNA酶进入实验系统。参考第二页“防止RNA酶污染的注意事项”改善实验条件和实验环境。

D. 电泳检测时，应使用变性胶电泳。

### 2、RNA提取得率低

A. Buffer WA、Buffer WBR中未加入无水乙醇，请确保试剂盒使用前已经在Buffer WA和Buffer WBR中加入无水乙醇。

B. 洗脱效率低，加入洗脱液RNase-Free Water后，延长静置时间5~10分钟可提高回收效率。

C. 样本中RNA含量低，应当适当增加样本的使用量。

### 4、RNA后续实验效果不佳

A. 盐分残留过多。注意Buffer WA和Buffer WBR的洗涤顺序，确保按正确的顺序洗涤纯化柱。

B. 乙醇残留过多。注意高速空离步骤不可省略，并且空离后的核酸纯化柱应小心取出，避免倒置，以免使2 ml离心管管底的残留滤液接触到核酸纯化柱。

C. 使用了过多的RNA用作逆转录模板。通常20  $\mu$ l 逆转录反应体系中加入100-1000 ng RNA作为模板比较适宜。

D. 逆转录后的DNA-RNA复合体对荧光PCR的影响。建议减少随机引物的用量或用特异性引物进行反转录，或者在反转录后添加RNase H进行处理，去除DNA-RNA复合体。

# 订购信息

样本类型	可适用的试剂盒	产品目录号
RNA 纯化	A&DPure 微量细胞/组织总 RNA 试剂盒	A-5001150
	A&DPure 全血总 RNA 试剂盒	A-5201050
	A&DPure Carrier RNA	A-4003101
	A&DPure mi RNA 纯化试剂盒	A-5007050
	A&DPure 动物组织总 RNA 试剂盒	A-5001050
	A&DPure Trizol 试剂	A-5301100
	A&DPure Trizol 柱纯化总 RNA 试剂盒	A-5003050
	A&DPure 病毒 RNA 纯化试剂盒	A-4001050
	A&DPure 超敏病毒 RNA 纯化试剂盒	A-4003050
	A&DPure 细菌总 RNA 试剂盒	A-5005050
	A&DPure 病毒 RNA 纯化试剂盒	A-4001050
	A&DPure 植物总 RNA 试剂盒	A-5101050
	A&DPure 培养细胞总 RNA 试剂盒	A-5004050
	A&DPure RNA 纯化试剂盒	A-5401050
	A&DPure DNA/RNA 同步纯化试剂盒	A-5002050
	A&DPure DNA/RNA/Protein 同步纯化试剂盒	A-5008050
	A&DPure RNA 样本保存液	A-4007020
	A&DPure RNA 保护剂	A-4006002
	RT-PCR	A&DMix cDNA 第一链合成试剂盒
A&DMix 2×Probe qPCR Mix		A-7206100
A&DMix 2×One Step Probe RT-PCR Mix		A-7406100
A&DMix Taq 酶抗体 (5U/μl)		A-7702050
A&DMix 20 ×SYBR Green I		A-7708001
A&DMix 50 ×ROX Reference Dye		A-7709005
A&DMix dNTPs 10mM each		A-7701100
A&DMix Taq 酶 (5U/μl)		A-8004050.
A&DMix 2×SYBR Green PCR Mix		A-7106100
A&DMix 2×SYBR Green PCR MixII		A-7107100



## 目录

### 产品组成1

产品储存与有效期 1

### 技术支持1

产品介绍 1

质量保证 1

防止RNA酶污染的注意事项 2

### 其他需要注意的事项2

用户需自备的试剂与物品 2

产品适用的样本范围 2

### 操作步骤分析与说明3

#### 起始样本3

样本匀质 3

柱纯化技术 3

操作流程图示 4

使用前准备 4

操作步骤 5

#### 从人或动物组织中分离纯化总RNA5

从培养的动物细胞中分离纯化总RNA 6

从植物组织/植物细胞/酵母/细菌中分离纯化总RNA7

从全血中分离纯化总RNA 8

从骨头、皮肤组织或结缔组织中分离纯化总RNA 9

常见问题分析10