

总 RNA 小量提取试剂盒（升级版）

本试剂盒采用硅膜柱纯化技术，全程无需苯酚/氯仿抽提、醇沉淀步骤，20 分钟即可快速获取完整高纯度 RNA。配备 gDNA 去除柱，可高效清除基因组 DNA 残留，适配对微量 DNA 污染高度敏感的各类下游实验。

体系采用强变性裂解体系，快速灭活内源 RNase，提取 RNA 完整性高；搭配专用硅基质吸附膜与配套缓冲液，特异性捕获核酸，经多步洗涤彻底去除蛋白、酶抑制剂等杂质。纯化所得 RNA 以无酶纯水洗脱，无蛋白、核酸酶残留，可直接用于 RT-qPCR、NGS 测序等分子实验，短期-20℃、长期-80℃稳定保存。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-MN-MS -RNA-V2-10	UE-MN-MS -RNA-V2-50	UE-MN-MS -RNA-V2-250
Kit size	10 preps	50 preps	250 preps
gDNA removing/RNA binding Column	20 个	100 个	500 个
Collection Tubes (2mL)	20 个	100 个	500 个
Buffer RL-1	8 mL	40 mL	200 mL
Buffer PL-1	8 mL	40 mL	200 mL
Buffer RW1	8 mL	40 mL	200 mL
Buffer RW2	2.4 mL	12 mL	60 mL
RNase-Free ddH ₂ O	2 mL	10 mL	30 mL
Protocol manual	1	1	1

Buffer RL-1/Buffer PL-1：细胞裂解液。根据细胞样本类型，进行选择使用，详见表 1。室温密闭贮存。低温下可能会有沉淀析出，需在 60℃水浴让沉淀完全溶解并冷却至室温后使用。
Buffer RW1：洗涤液 1。室温密闭贮存。
Buffer RW2：洗涤液 2。使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇（可用 100% 乙醇或 95%乙醇）。混合均匀，室温密闭贮存。
RNase-Free ddH₂O：洗脱液。室温密闭贮存。

二、注意事项

- 1. RNA 提取完成后建议置于冰上待用，若不能立刻进行后续实验，请保存于-80℃。
- 2. RNA 分管尽快使用，电泳检测用无酶水进行冲洗，电泳缓冲液用 RNA 无酶水配置，提高电压并缩短跑胶时间。
- 3. 选新鲜组织样本，避免反复冻融，组织离体后须迅速放入液氮中速存，后期转移至-80℃长期保存。
- 4. 所有试剂用 DEPC 处理过的溶剂配制。请选用 RNase-free 枪头和离心管，以避免提取过程中 RNA 被 RNase 降解。

三、实验准备

- 1. 自备试剂：70%乙醇（无核酶水配置）、无水乙醇（AR）、β-巯基乙醇或 DTT。
- 2. Buffer RL-1/Buffer PL-1 低温下可能会有沉淀析出，需在 60℃水浴让沉淀完全溶解并冷却至室温后使用。
- 3. Buffer RW2 为浓缩液，使用前按试剂瓶子标签，加入无水乙醇。
- 4. (可选)提升裂解液的变性能力：使用前分装适量 Buffer RL-1/Buffer PL-1，按每 mL Buffer RL-1/Buffer PL-1 加入 10μL β-巯基乙醇或 20μL 的 2M DTT，混合液室温可保存 1 月。β-巯基乙醇/DTT 能打断 RNase 分子间的二硫键，高效灭活 RNase，提高 RNA 质量。由于β-巯基乙醇/DTT 的毒性，若简单样本，不添加也可以得到完整的 RNA。
- 5. 对于植物样本，若不确定种类，推荐优先尝试 Buffer PL-1 。

样本种类	推荐样本量	样本示例	推荐裂解液	
			Buffer RL-1	Buffer PL-1
细胞/阴性 细菌	< 10 ⁷ 个	通用	√	
动物组织	≤20mg	通用	√	
简单植物组织 （叶片、根、茎）	50-100mg	小麦、水稻、玉米、菠菜、娃娃菜、豌豆苗、根茎	√	
多糖多酚植物叶片		桃叶、梅叶、梨叶、葡萄叶、月季花瓣		√
淀粉含量高的植物组织	20-50mg	玉米种子、红豆种子、土豆		√
油性高的植物组织		油菜籽	√	√
水果果肉类植物	100-500mg	西瓜、苹果	√	
真菌类植物	20-100mg	香菇、金针菇		√

表 1 不同种类样本推荐的样本处理量及裂解液

四、操作步骤

【样本前处理】

A：细胞

- 1. 不同细胞类型
 - a) 在悬浮培养液中的细胞（不要使用超过 1 x 10⁷ 个细胞）
确定细胞数量。通过在离心管中以 500 x g 离心 5 分钟，沉淀适量的细胞。小心吸弃所有上清液。执行步骤 2。
**未完全去除细胞培养基会抑制裂解并稀释裂解液，影响 RNA 结合条件，降低 RNA 产量。*
 - b) 在单层培养的细胞（不要使用超过 1 x 10⁷ 个细胞）
细胞可以直接在细胞培养器皿（直径不超过 10 厘米）中裂解，或者在裂解之前通过胰酶处理并收集为细胞沉淀。在细胞培养瓶中培养的细胞应始终经过胰酶处理。
 - 直接裂解细胞：确定细胞数量。完全吸弃细胞培养基。执行步骤 2。
 - 胰酶处理和收集细胞：确定细胞数量。吸弃培养基，用 PBS 洗涤细胞。吸去 PBS，向其中加入 0.1-0.25% 的 PBS 中的胰酶。在细胞从培养皿或瓶中脱离后，加入含有血清以灭活胰酶的培养基，将细胞转移到不含 RNase 的离心管（未提供），在 500 x g 离心 5 分钟。完全吸弃上清液。执行步骤 2。
**未完全去除细胞培养基会抑制裂解并稀释裂解液，影响 RNA 结合条件，降低 RNA 产量。*
- 2. 加入 350μL 或 700μL Buffer RL-1，用一次性注射器或移液枪吹打裂解液 10~20 次，吹散细胞，然后涡旋 10 秒。继续执行步骤 3。
 - ≤2 x 10⁶ 细胞：加入 350μL Buffer RL-1
 - >2 x 10⁶ 细胞：加入 700μL Buffer RL-1

B：组织样本

- 1. 称取适量的组织样本（详见表 1 推荐的样本量），选择合适的组织匀浆 方式进行匀浆（可选用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器、珠磨仪等工具，优选使用液氮研磨，低温液氮可保护 RNA 不降解）。
- 2. 加入 700 μL Buffer RL-1/Buffer PL-1（详见表 1，已加入β-巯基乙醇或 DTT），用一次性注射器或移液枪吹打裂解液 10~20 次，涡旋混匀 10 秒，12,000 x g 或最高转速离心 5 分钟，立刻继续执行步骤 3。
**在后续步骤中仅使用该上清液（裂解物），因为组织匀浆后未能被裂解液溶解的残余不溶物有可能导致柱子的堵塞。*

【纯化步骤】

3. 将匀浆裂解物转移到已放置在 2mL 收集管中的 gDNA removing 离心柱中。12,000 x g 离心 1 分钟。丢弃 gDNA removing 离心柱，保留滤液。
4. 加入等体积的 70%乙醇至滤液中（若提取植物样本，需改为加入 0.5 倍体积的无水乙醇至滤液中），移液枪吹打 10~20 次。
*加入乙醇后可能有可见沉淀物，这不会影响后续实验。
5. 转移≤750μL 混合液（包含絮状沉淀）至已放置在 2mL 收集管中的 RNA binding Column 中，12,000 x g 离心 1 分钟。弃去滤液，柱子装回收集管中。
*在该步骤及接下来的离心步骤中，应小心分离柱子和收集管，避免柱子与滤液接触。如果不小心滤液触碰到了柱子上的膜，可弃去滤液后再次 14,000 x g 离心 1 分钟。
6. 转移剩余混合液至柱子中，12,000 x g 离心 1 分钟。弃去滤液，柱子装回收集管中。
7. 加入 700μL Buffer RW1 至柱中，12,000 x g 离心 1 分钟。弃去滤液，柱子装回收集管中。
8. 加入 500μL Buffer RW2 至柱中，12,000 x g 离心 1 分钟。弃去滤液，柱子装回收集管中。
9. 加入 500μL Buffer RW2 至柱中，12,000 x g 离心 1 分钟。弃去滤液，柱子装回收集管中。
10. 12,000 x g 离心空柱 3 分钟去除乙醇。
*残留乙醇会影响后续酶促扩增反应，因此去除残留乙醇非常重要。
11. 将柱子装在新的 1.5mL 离心管中，不盖管盖，室温放置 3 分钟后，向膜中央加入 30~100μL RNase-Free ddH₂O，室温静置 3 分钟。12,000 x g 离心 1 分钟，收集溶液，保存于-20℃。