

总 RNA 提取 I 型试剂盒 中文操作说明

E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I

货号	R6834-00	R6834-01	R6834-02
反应次数	5 次	50 次	200 次
HiBind [®] RNA Mini Columns	5 个	50 个	200 个
RNA Homogenizer Spin Column	5 个	50 个	200 个
2 mL Collection Tubes	10 个	100 个	400 个
TRK Lysis Buffer	5 mL	40 mL	150 mL
RNA Wash Buffer I	5 mL	50 mL	200 mL
RNA Wash Buffer II	5 mL	12 mL	50 mL
Nuclease-free Water	5 mL	10 mL	40 mL
User Manual	✓	✓	✓

★ 保存方式及稳定性

1. 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输；
2. 当贮存温度较低时，TRK Lysis Buffer 易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37°C 中，至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用；
3. 本试剂盒仅限科学研究使用。

★ 实验前准备

1. 按照下表提示，使用【无水乙醇】对 RNA Wash Buffer II 进行稀释，稀释后室温保存；

货号	无水乙醇 加入量
R6834-00	20 mL
R6834-01	48 mL
R6834-02	200 mL

2. (可选) 每毫升 TRK Lysis Buffer 需加入 20 μ L 2-巯基乙醇，该混合液可室温贮存两周。

★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 离心转速可达 14,000xg 的小型离心机
- ✓ 无 RNase 的吸头及 1.5mL 离心管
- ✓ 无水乙醇、70%乙醇（由无酶水配置）
- ✓ 匀浆工具（如针管针头、研磨棒、玻璃珠、自动匀浆仪）
- ✓ （可选）14.3M 2-巯基乙醇、真空抽滤装置、DNase I 消化套装

★ 提取步骤 —— 细胞样品

1. 使用正确数量的培养细胞对获得最佳提取效果至关重要。HiBind® RNA Mini Column 的最大结合能力为 100µg。TRK Lysis Buffer 可有效裂解的最大细胞数为 1×10^7 。如首次进行实验，我们建议从 1×10^6 个细胞开始尝试提取，如获得理想产量后，可在下一次提取中适当增加样品量。

2. 按照如下方法收集不超过 1×10^7 数量的细胞：

✓ 悬浮培养细胞：

1. 500xg 离心 5 分钟收集细胞，弃去上清培养液；
2. 接第 3 页第 3 步继续操作。

✓ 贴壁培养细胞：

注意：贴壁培养可以选择在培养皿中直接裂解，也可选择用胰蛋白酶消化后作细胞沉淀收集。在培养瓶中生长的细胞，我们建议使用胰蛋白酶进行消化。

1) 直接裂解操作办法：

1. 弃除培养基；
2. 接第 3 页第 3 步继续操作。

2) 胰蛋白酶消化及细胞收集操作办法：

1. 弃除培养基并使用 PBS 溶液对细胞进行洗涤；若培养基清洗不彻底，可能会抑制胰蛋白酶活性；
2. 盐溶液中加入 0.1-0.25%的胰蛋白酶，室温孵育 3-5 分钟让细胞分散；
3. 加入等体积含有血清的细胞培养基使胰蛋白酶失活，转移到无酶的离心管内；

4. 室温, 500xg 离心 5 分钟, 去除上清培养基

5. 接第 3 页第 3 步继续操作。

3. 参考以下细胞量加入 TRK Lysis Buffer, 涡旋或上下吸打彻底混匀;

细胞数量	TRK Lysis Buffer 加入体积
< 5×10^6	350 μ L
< 1×10^7	700 μ L

4. 选择下述任一办法进行匀浆:

1) 使用注射器及针头: 把裂解物在窄针头 (19-21 规格) 内反复吸打 5-10 次让细胞组织尽量分散, 接步骤 5 往下操作;

2) 使用 RNA Homogenizer Spin Column: 将试剂盒配套匀浆柱套入 2mL 离心管中, 再将裂解液转移至匀浆柱中, 室温 14,000xg 离心 2 分钟去除不溶解的杂质, 弃除匀浆柱, 收集滤液。接步骤 5 往下操作。

5. 加入与滤液等体积的 70%乙醇, 涡旋彻底混匀, 请勿进行离心或瞬时离心;

6. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套入收集管中, 转移第 4 步得到的混合液到结合柱中 (每次转移的混合液 $\leq 700\mu$ L), 室温 10,000xg 离心 1 分钟, 弃滤液;

7. 重复步骤 6, 直至所有混合液都结合到 HiBind[®] RNA Mini Column 上;

可选 DNase I 消化步骤 (需另购 DNase I Set 货号 E1091)

如需使用 DNase I 对 DNA 污染进行消解, 请参考第 6 页 “DNase I 消化步骤”。如无需进行 DNA 消解, 请接着按第 8 步操作;

8. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套入收集管中, 加入 500 μ L RNA Wash Buffer I 至结合柱中, 10,000xg 离心 30 秒, 弃滤液;

9. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套回收集管中, 加入 500 μ L RNA Wash Buffer II 至结合柱中, 10,000xg 离心 1 分钟, 弃滤液;

注意: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

10. 重复步骤 9;

11. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套回收集管中, 10,000xg 离心空甩 2 分钟;

12. 将 HiBind® RNA Mini Column 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 30-70 μL Nuclease-free Water 至结合柱中，10,000 $\times\text{g}$ 离心 2 分钟洗脱 RNA，产物放置 -70°C 保存。

注意：以下操作可能帮助提高 RNA 产量：

- 使用前将 Nuclease-free Water 70°C 预热；
- 室温静置 5 分钟；
- 增加洗脱液的体积；
- 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）或将第一次洗脱出的 Nuclease-free Water 重新加至结合柱中进行二次洗脱（可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积）。

★ 提取步骤 —— 动物组织样品

1. 使用正确组织起始量对获得最佳提取效果至关重要。HiBind® RNA Mini Column 的最大结合能力为 100 μg 。TRK Lysis Buffer 可有效裂解的最大组织量为 30mg。如首次进行实验，我们建议从 10mg 样品量开始尝试提取，如获得理想产量后，可在下一次提取中适当增加样品量；
2. 参考以下组织量加入 TRK Lysis Buffer 并选择下述任一办法进行匀浆；

组织量	TRK Lysis Buffer 加入体积
$\leq 15 \text{ mg}$	350 μL
20-30 mg	700 μL

注意：如样品贮存在 RNALater® 请使用 700 μL TRK Lysis Buffer。

- A. 使用组织匀浆仪对样品进行匀浆，请参考原文说明书第 10 页；
- B. 使用液氮对样品进行研磨，详细操作请参考原文说明书第 9 页；原文说明书可通过扫描第 8 页二维码获取。

- 1) 使用注射器及针头：把裂解物在窄针头（19-21 规格）内反复吸打 5-10 次让细胞组织尽量分散；接步骤 3 往下操作。
- 2) 使用 RNA Homogenizer Spin Column：将试剂盒配套匀浆柱套入 2mL 离心管中，再将裂解液转移至匀浆柱中，室温 14,000 $\times\text{g}$ 离心 2 分钟去除不溶解的杂质，弃除匀浆柱，收集滤液，接步骤 4 往下操作。

3. 常温最大速度(> 13,000xg)离心 5 分钟去除不溶解的杂质;
4. 加入与滤液等体积的 70%乙醇, 涡旋彻底混匀, 请勿进行离心或瞬时离心;
5. 将 HiBind[®] RNA Mini Colum 套入收集管中, 转移第 3 步得到的混合液到结合柱中 (每次转移的混合液≤700μL), 室温 10,000xg 离心 1 分钟, 弃滤液;
6. 重复步骤 5, 直至所有混合液都结合到 HiBind[®] RNA Mini Column 上;
可选 DNase I 消化步骤 (需另购 DNase I 消化套装 #E1091)
如需使用 DNase I 对 DNA 污染进行消解, 请参考第 6 页 “DNase I 消化步骤”。如无需进行 DNA 消解, 请接着按第 7 步操作;
7. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套入收集管中, 加入 500μL RNA Wash Buffer I 至结合柱中, 10,000xg 离心 30 秒, 弃滤液;
8. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套回收集管中, 加入 500μL RNA Wash Buffer II 至结合柱中, 10,000xg 离心 1 分钟, 弃滤液;
注意: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。
9. 重复步骤 8;
10. 将 HiBind[®] RNA Mini Column 套回收集管中, 10,000xg 离心空甩 2 分钟;
11. 将 HiBind RNA Mini Column 套入新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-70μL Nuclease-free Water 至结合柱中, 10,000xg 离心 2 分钟洗脱 RNA, 产物放置-70°C 保存。
注意: 以下操作可能帮助提高 RNA 产量:
 - 使用前将 Nuclease-free Water 70°C预热;
 - 室温静置 5 分钟;
 - 增加洗脱液的体积;
 - 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱 (可增加产量, 但会导致浓度降低) 或将第一次洗脱出的 Nuclease-free Water 重新加至结合柱中进行二次洗脱 (可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积)。

★ DNase I 消化步骤 (可选步骤)

用户自备试剂：DNase I Digestion Set (货号 E1091)

按照上述《细胞或组织提取步骤》完成 1-7 步或《动物组织提取步骤》完成 1-6 步后，请按以下步骤操作：

1. 每一个 HiBind® RNA Mini Column，按照按下表配置 DNase I 溶液：

溶液名称	每份配量
Digestion Buffer	73.5 μ L
RNase-Free DNase I	1.5 μ L
总量	75 μ L

重要提示：

- ✓ DNase I 非常敏感且易发生物理变性，切勿大力涡旋 DNase I 溶液。建议轻柔颠倒离心管进行混匀；
 - ✓ DNase I 混合液需现配现用；
 - ✓ 请使用套装内配套的 Digestion Buffer 消化液，其他消化液与膜上消化操作不配套，可能会降低 RNA 产量及纯度；
 - ✓ 全部操作均在室温下进行，请谨慎且尽量快速地操作。
2. 将 HiBind® RNA Mini Column 套入 2ml 收集管中，往 HiBind® RNA Mini Column 加入 250 μ L RNA Wash Buffer I，10,000 \times g 室温离心 1 分钟，弃掉滤液；
 3. 将配置好的 75 μ L 的 DNase I 溶液，转移至 HiBind® RNA Mini Column 膜的正中央，切勿打到结合柱壁；
 4. 室温静置 15 分钟；
 5. 加入 250 μ L RNA Wash Buffer I 至 HiBind® RNA Mini Column 中，室温静置 2 分钟，10,000 \times g 离心 1 分钟，弃滤液；
 6. 将 HiBind® RNA Mini Column 套回收集管中，加入 500 μ L RNA Wash Buffer II 至结合柱中，10,000 \times g 离心 1 分钟，弃滤液；

注意：RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

7. 重复步骤 6；
8. 将 HiBind® RNA Mini Column 套回收集管中，10,000xg 离心空甩 2 分钟；
9. 将 HiBind® RNA Mini Column 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 30-70 μ L Nuclease-free Water 至结合柱中，10,000xg 离心 2 分钟洗脱 RNA，产物放置 -70°C 保存。

注意：以下操作可能帮助提高 RNA 产量：

- 使用前将 Nuclease-free Water 70°C 预热；
- 室温静置 5 分钟；
- 增加洗脱液的体积；
- 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）或将第一次洗脱出的 Nuclease-free Water 重新加至结合柱中进行二次洗脱（可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积）。

★ 产品信息卡



更多详情，请扫描左方二维码获取原文说明书
中文翻译仅供辅助阅读



常见问题合集及操作注意事项
请扫描左方二维码获取



中国总代理：广州飞扬生物工程有限公司

技术支持：020-32051125

企业 QQ：800848200（人工客服在线）

中文网站：**omegabiotek.com.cn**

如需查询代理商名录，请关注“飞扬生物”微信号获取

★ 提取步骤示意图

离心操作流程



加入 TRK Lysis Buffer
裂解



匀浆，转移到匀浆柱离心过
滤



往滤液中加入无水乙醇
并转移到结合柱内



洗涤



干燥



洗脱

真空抽滤操作流程



加入 TRK Lysis Buffer
裂解



匀浆，转移到匀浆柱离心过
滤



往滤液中加入无水乙醇
并转移到结合柱内



洗涤



干燥



洗脱