

MonPure™
Universal RNA Kit

MI10001S

使用说明书

Version 2.0

【产品名称】

英文名称: MonPure™ Universal RNA Kit

中文名称: 超纯总 RNA 提取试剂盒

【包装规格】

50 Preps / 盒

【产品介绍】

本试剂盒可从多种细胞、动物、植物组织，细菌及培养物中提取总 RNA。在匀质化或溶解的样本中，Buffer TL 能溶解细胞并释放 RNA，通过萃取离心后将存在于水相中的 RNA 高效专一的结合在核酸纯化柱上，通过数次洗涤最大限度的有效去除蛋白质、无机离子及有机杂质等，最终可在 20~40 分钟内得到高纯度的 RNA 样品。本试剂盒提取得到的 RNA 可直接用于 Northern blot 分析、斑点杂交、poly(A)+ 选择、体外翻译、RNA 酶保护分析等实验。

【适用范围】 适用于各种人类、动物、植物或细菌来源的组织、细胞中的总 RNA 的分离纯化，各样本推荐用量如下表：

| 样本 | 推荐用量 |
|------------------|-------------------------------|
| 动物组织（肝脏、脑等易匀浆组织） | 10~100 mg |
| 动物组织（皮肤、骨头等组织） | 100~200 mg |
| 血液（红细胞有核生物） | 200 μ l |
| 血液（红细胞无核生物） | 300~500 μ l |
| 培养细胞 | 5~10 \times 10 ⁶ |
| 细菌 | 50~100 mg |
| * 植物组织 | 50~100 mg |

* 某些植物组织中多糖含量较高，不适用本产品，推荐使用高多糖多酚植物总 RNA 试剂盒（MI10101）提取 RNA。

【主要组成成分】

| 组分 / 规格 | MI10001S (50Preps) | 储存条件 | 运输条件 |
|---------------------------|--------------------|-----------|------|
| MonPure™ pestles | 50 支 | 室温或 2~8°C | 室温 |
| MonPure™ Spin Columns | 50 套 | 室温或 2~8°C | 室温 |
| Universal RNA Buffer TL | 55 ml | 2~8°C | 室温 |
| Universal RNA Buffer EX | 12 ml | 室温或 2~8°C | 室温 |
| Universal RNA Buffer DW | 10 ml | 室温或 2~8°C | 室温 |
| Universal RNA Buffer WA | 12 ml | 室温或 2~8°C | 室温 |
| Universal RNA Buffer WBR | 10 ml | 室温或 2~8°C | 室温 |
| MonPure™ RNase-free Water | 2 ml*3 | 室温或 2~8°C | 室温 |
| 说明书 | 1 份 | 室温 | 室温 |

【储存条件及有效期】

1. Buffer TL 请置于 2~8°C 储存。
2. 其他物品和试剂如果储存于常温，可在三年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8°C，可延长产品的有效期至三年以上。

【自备材料】

- a) 自备试剂：无水乙醇；
- b) 自备耗材：1.5 ml RNase-free 离心管、吸头、移液器；
- c) 自备设备：涡旋振荡器、台式离心机（可适配 1.5 ml / 2 ml 离心管）、程序式冷冻组织破碎仪（可选）；

【实验流程】

一、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 DW、Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并做好标记。
3. 当使用 Buffer TL、Buffer EX、Buffer WA 工作时，请穿戴乳胶手套、口罩、防护眼镜和实验服，避免沾染皮肤、眼睛，谨防吸入口鼻。
4. 操作过程在专用的 RNA 实验室，使用 RNase-free 的实验器具等。

操作流程示意图



二、样本前处理

1. 易匀浆的人或动物组织中（肌肉、肝脏及脑等组织）

称取 50~100 mg 人或动物组织，快速切成小颗粒后立即转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 500 μ l Buffer TL，用研磨棒（或使用程序式冷冻组织破碎仪 GS60201）研磨至无明显颗粒，再补加 500 μ l Buffer TL，用力摇晃 15 秒混匀，进入总 RNA 提取步骤 1。

* 尽量减短切碎组织所花的时间，以减少组织内源性的 RNA 酶对 RNA 的降解。

* 可选步骤：若样本中含有较多蛋白质、脂肪、多糖或胞外物质（肌肉部分等）可于 12,000 rpm (10,012 g) 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，如果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. 贴壁培养的动物细胞

每 10 cm² 培养细胞中加入 1 ml Buffer TL（比如直径为 3.5 cm 的细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入 1 ml Buffer TL），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，进入总 RNA 提取步骤 1。

3. 悬浮培养的动物细胞

用 1.5 ml 离心管离心收集 5~10 \times 10⁶ 的细胞，加 100 μ l PBS 溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮。加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，进入总 RNA 提取步骤 1。

4. 植物组织 / 植物细胞 / 细菌

收集 300~500 mg 样本并转移到研钵中，加入液氮后将样本研磨至粉末状（或使用程序式冷冻组织破碎仪 GS60201）。再用液氮预冷的 1.5 ml 离心管称取 50~100 mg 粉末，加入 1 ml Buffer TL，用力摇晃 15 秒混匀，进入总 RNA 提取步骤 1。

* 尽量在样本尚未融化前加入 Buffer TL，以减少组织内源性的 RNA 酶对 RNA 的降解。

* 可选步骤：若样本中含有较多蛋白质、脂肪、多糖或胞外物质（植物结节部分等）可于 12,000 rpm (10,012 g) 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。如果样本中脂肪含量高，上层油脂应去除，取澄清的匀浆液进行下一步操作。

5. 全血或骨髓

无核红细胞抗凝全血或骨髓样本处理（冷冻溶血的样本不适用）：加入 1.2 ml 红细胞裂解液到离心管，再加入 300 μ l 抗凝全血或骨髓，盖上管盖后颠倒混合均匀，室温静置 5 分钟，3000 rpm (625 g) 离心 5 分钟，弃上清，保留管底白细胞沉淀，加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，进入总 RNA 提取步骤 1。

* 300 μ l 抗凝全血能提取到 1~2 μ g 的 RNA，如需增加抗凝全血的用量，按比例增加红细胞裂解液，其它条件不变。

* 不适用已经被冷冻过的抗凝全血（比如 -70 $^{\circ}$ C 冰箱冻存）。

* 红细胞裂解液：NH₄Cl 8.02 g，NaHCO₃ 0.84 g，EDTA 0.37 g 溶于 1 L 水中。

有核红细胞抗凝全血样本处理：取 200 μ l 全血到 1.5 ml 离心管中，加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吹打血样数次使细胞溶解，进入总 RNA 提取步骤 1。

6. 人或动物的骨头、结缔组织（皮肤等）

先将骨头用锤子敲碎或将组织切碎，称取 400~600 mg 碎片并转入研钵中，在研钵中加入液氮并将样本碎片（或使用程序式冷冻组织破碎仪 GS60201）研磨至粉末状。用液氮预冷过的 1.5 ml 离心管称取 100~200 mg 粉末，加入 1 ml Buffer TL，用力摇晃 15 秒混匀，进入总 RNA 提取步骤 1。

三、总 RNA 提取步骤

1. 加入 200 μ l Buffer EX 于管中，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12,000 rpm (10,012 g) 离心 15 分钟。
2. 吸取 600 μ l 上层水相转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 600 μ l Buffer DW，勿弃吸头，直接用吸头混匀。
3. 吸取 600 μ l 2 中混合液转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12,000 rpm (10,012 g) 离心 30 秒，弃滤液。
4. 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转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12,000 rpm (10,012 g) 离心 30 秒，弃滤液。
5. 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 μ l Buffer WA，盖上管盖，12,000 rpm (10,012 g) 离心 30 秒，弃滤液。

- 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入 600 μ l Buffer WBR, 盖上管盖, 12,000 rpm (10,012 g) 离心 30 秒, 弃滤液。
- 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 14,000 rpm (13,628 g) 离心 1 分钟, 弃 2 ml 离心管。
- 将核酸纯化柱置回到一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中, 在纯化柱中加入 50 μ l RNase-free water, 盖上管盖, 室温静置 1 分钟, 12,000 rpm (10,012 g) 离心 30 秒。
- 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°C 以下备用。

【常见问题与解决方案】

| 问题描述 | 可能原因 | 解决方法 |
|--------------|---|--|
| RNA 得率低 | 样本中 RNA 含量太高 | 减少样本的使用量。 |
| | 样本中粘多糖含量太高 | 选择多糖多酚植物 RNA 试剂盒 (MI10101S)。 |
| | 样品保存 | 选用新鲜的、未反复冻融的样本; 组织样本取材后应立即置于液氮中速冻, 然后移至 -70°C 冰箱保存; 细胞样本应在收集后直接加入 1 ml Buffer TL, 然后移至 -70°C 冰箱保存。 |
| RNA 后续实验效果不佳 | 样品处理 | 某些富含内源核酸酶的样本 (如肝脏, 胸腺等), 不可直接匀浆, 应在加入部分 Buffer TL 的条件下用研磨棒将组织研成匀浆状。 |
| | 外源 RNA 酶的污染 | 操作过程在专用的 RNA 实验室, 使用 RNase-free 的实验器具等。 |
| | 洗脱效率低 | 37°C 预热 RNase-free water 或增长纯化柱静置时间能提高 RNA 的洗脱效率; 过度干燥的纯化柱会不利于 RNA 的洗脱。 |
| | Buffer DW、Buffer WA、Buffer WBR 中未加入无水乙醇 | 确保试剂盒使用前已经在 Buffer DW、Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇。 |
| | 样本中 RNA 含量低 | 适当增加样本的使用量; 如样本未充分破碎或匀浆不彻底, 增加匀浆时间或使用组织匀浆仪器。 |
| | 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。 |
| | 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。 |
| | 过多的 RNA 用作反转录模板 | 通常 20 μ l 反转录反应体系中加入 100~1000 ng RNA 作为模板比较适宜。注意 cDNA 作为 PCR 模板时需要适当稀释, 以免残留的反转录酶 (包括已经失活的反转录酶) 干扰 Taq 酶的活性。 |
| | 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。 |
| DNA 残留 | 样本用量过多 | 选择合适的样本起始量。 |
| | 吸取到中间相 | 小心吸取水相, 若不慎吸取到中间相, 可将液体打回离心管, 盖上管盖, 用力摇晃 15 秒, 12000 g 离心 15 分钟后更换新吸头小心吸取水相。 |
| | 分相没有完全分开 | 加入 Buffer EX 后确实用力摇晃混匀, 12000 g 离心 15 分钟, 不要用旋涡振荡代替摇晃。 |
| | 预先用其他试剂处理 | 确保起始样本不含有有机溶剂 (如乙醇、DMSO)、强缓冲液或碱性试剂, 这些试剂会干扰相分离。 |

☎ 400-928-3698

莫纳生物科技有限公司
Monad Biotech Co., Ltd.

E-mail: support@monadbiotech.com
www.monadbiotech.com

