

版本号: DP141010

RNAprep Pure Micro Kit

RNAprep Pure

微量样品总RNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP420

产品内容

产品组成	DP420 (50 preps)
裂解液RL(Buffer RL)	30 ml
去蛋白液RW1(Buffer RW1)	40 ml
漂洗液RW(Buffer RW)	12 ml
Carrier RNA	310 µg
DNase I (1500 U)	1 支
缓冲液RDD(Buffer RDD)	4 ml
RNase-Free ddH ₂ O (管装)	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O (瓶装)	2 × 15 ml
RNase-Free吸附柱CR1 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR1 in a 2 ml Collection Tube)	50 套
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5 ml)	50 个

选配试剂

蛋白酶K (目录号: RT403); 研磨杵 (目录号: HC205);

过滤柱CS: (目录号: RK124)

储存条件

本试剂盒在室温(15-25°C)条件下运输, 收到试剂盒后, 请立即将RNase-free DNase I, 缓冲液RDD和RNase-free ddH₂O置于2-8°C保存, 其他试剂可置于室温 (15-25°C)保存。

产品简介

本产品采用全新技术从微量的组织和细胞中（少至10个细胞）进行RNA提取，本产品
在裂解液中添加了特殊组分，可大幅度提高RNA和硅基质膜的选择性结合能力。同时，在
RNA提取过程中，还加入RNase-Free DNase I，可完全去除痕量DNA杂质，而RNase-Free
DNase I和其他残留的物质会在随后的漂洗过程中去除，从而有效地保证了提取RNA的得率
和纯度。

与其它提取RNA的普通方法相比，微量样品RNA提取试剂盒将所有<200 bp的RNA
（5.8S rRNA, 5S rRNA和tRNAs等）选择性的筛除，而所有>200 bp的RNA则被富集、分离
和纯化。

在本说明书中，对于不同的样品有不同的操作步骤，这些步骤的区别主要在于样品的裂
解和结合至硅基质膜的条件不同，当RNA结合至硅基质膜后，后续步骤基本类似。

注意事项

1. 自备试剂与耗材： **β -巯基乙醇，无水乙醇，1.5 ml RNase-Free离心管**

2. 样品使用量的确定：

为了使用本试剂盒得到高产量和高纯度的RNA，使用样品的量是否得当是很重要的，因
为吸附柱的吸附量以及裂解液的用量有一定限制，只有保证样品充分的裂解及RNA充分吸
附在硅基质膜上，RNA的得率才有保证。表1是该试剂盒的技术指标，表2是在不同培养条件
下细胞的数量。

表1 微量样品RNA提取试剂盒技术指标

最大吸附能力	45 μ g RNA
吸附柱最大容量	700 μ l
提取RNA的长度	>200 bp
最小洗脱体积	10 μ l
样品使用最大量（动物细胞）	5×10^5
样品使用最大量（动物组织）	5 mg

**注意：如果超出该试剂盒的最大吸附能力，RNA的产量可能会降低，而如果样品未能裂
解完全，RNA的产量也会降低。**

表2 不同培养条件下HeLa细胞的数量

细胞培养器皿	生长面积 (cm ²)	细胞数量
96-孔细胞培养板	0.32-0.6	4-5 × 10 ⁴
48-孔细胞培养板	1	1 × 10 ⁵
24-孔细胞培养板	2	2.5 × 10 ⁵
12-孔细胞培养板	4	5 × 10 ⁵
6-孔细胞培养板	9.5	1 × 10 ⁶
平皿 (35 mm)	8	1 × 10 ⁶
摇瓶 (40-50 ml)	25	3 × 10 ⁶

3. 样品的储存和处理

组织若不经处理，其中的RNA 处于无保护状态，容易被降解，所以新鲜组织应及时放入液氮中速冻并立即储存于-70℃，冻存的组织不能反复冻融以避免RNA的降解，样品也可以在匀浆后加入裂解液RL，储存于-70℃，冻存的样品可稳定储存数月。

4. 样品的裂解和匀质

有效的裂解和匀质是提取RNA的重要步骤，裂解和匀质是两个不同的步骤。

裂解：将组织和细胞完全裂解，以彻底释放出样品中所有的RNA，不同的样品裂解的方法不同，如果样品裂解不彻底，将导致RNA得率低。

匀质：匀质的过程是为了降低细胞裂解后的溶液粘度，将高分子量的基因组DNA和其他物质切断，形成均一的溶液，利于RNA与硅基质膜的结合。如果匀质过程未处理好，将影响RNA与硅基质膜的结合，从而导致RNA提取量低。匀质的方法包括匀浆、涡旋振荡、过滤柱、注射器或枪头吸取等。

5. Carrier RNA:

当处理<10 μg组织或<5000个细胞时，可将试剂盒中提供的Carrier RNA加入裂解液中，实验证明，Carrier RNA的加入将提高RNA的得率，且不会影响后续实验。

操作前的注意事项

1. 为了防止RNA的降解，请避免未处理的样品在室温长时间放置，在组织固定前，RNA处于无保护状态，所以请将组织在液氮中速冻。
2. 组织裂解液（在裂解液RL中）可在-70°C储存数月。处理冻存的裂解液时，可在室温或37°C水浴中将样品完全解冻，而且请注意裂解液中的盐需要完全溶解，之后立即进行后续操作。（长时间37°C处理将会导致RNA的化学降解）。
3. 所有步骤在室温进行，为了尽量避免RNA的降解，操作越快越好。
4. 在使用前，请用RNase-Free ddH₂O配制乙醇溶液。
5. 操作前在RL中加入β-巯基乙醇至终浓度1%，如1 ml RL中加入10 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RL可在4°C放置一个月，裂解液RL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
6. 第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。

相关溶液的配制

DNase I储存液的配制：请小心打开装有DNase I的玻璃管盖子，以避免造成DNase I的损失，将DNase I干粉（1500 U）溶解在550μl RNase-Free水中，轻柔地上下颠倒混匀DNase I溶液，不要涡旋振荡。

如需长时间保存DNase I溶液，请将玻璃瓶中的DNase I溶液进行分装，在-20°C可保存9个月，DNase I溶液融化后可在2-8°C保存6周，溶解后的DNase I溶液不能再次冷冻。

Carrier RNA储存液的配制：在第一次使用Carrier RNA时，将Carrier RNA（310 μg）溶解在1 ml RNase-Free ddH₂O中，将溶液分装后储存于-20°C，此时该溶液的浓度为310 μg/ml（310 ng/μl）；该储存液应避免反复冻融，冻融次数不能超过3次。（当处理的细胞量小于5000个时，请在裂解液中加入Carrier RNA。）

Carrier RNA工作溶液的配制（以配制10次用量为例）：将5 μl Carrier RNA储存溶液加入34 μl裂解液RL中，用移液器混匀，将混匀后的溶液6 μl加入54 μl裂解液RL中，此时Carrier RNA终浓度为4 ng/μl，取5 μl终浓度为4 ng/μl的Carrier RNA加入裂解液中。

一 从微切割的冷冻样品中提取总RNA

以下的操作步骤适用于从冷冻的微切割动物组织中分离RNA。要从非常微量的样品中提取RNA是一项很有挑战性的工作，同时要注意，固定和处理样品的过程可能会对RNA完整性造成影响。

1. 向样品中加入适量的裂解液RL(使用前请加入 β -巯基乙醇，终浓度为1%) (加入裂解液RL的体积与微切割仪器容积有关，但不能超过最大体积为 (A) 65 μ l (B) 300 μ l。)

注意：(A)指的是微切割仪器Leica AS LMD系统可采用的体积，(B)指的是其他微切割系统可使用的裂解液体积，以下出现的(A) (B)与此一致。

2. 如果需要，可将样品和裂解液RL转移至一个较大的1.5 ml或2 ml RNase-Free的离心管中（客户自备）。补充裂解液RL至体积为(A)75 μ l (B)350 μ l。

注意：(A) (B)所指的意义同步步骤1，当处理的细胞量小于5000个时，向溶液中加入20 ng Carrier RNA（5 μ l 4 ng/ μ l Carrier RNA），Carrier RNA溶液的配制请见第4页溶液配制说明。

3. 涡旋振荡30 sec，使样品匀质化。

4. 向样品中加入1倍体积（(A)75 μ l (B)350 μ l）70%乙醇，用移液器混匀，立即进行第5步。

注意：如果在匀质的过程中损失了一些裂解液，70%乙醇的加量也要相应减小。在加入乙醇后，溶液中可能会出现沉淀，但不会影响RNA的提取。

5. 将所有溶液及沉淀全部转移至吸附柱CR1上(吸附柱CR1放在RNase-Free的2 ml收集管中，该收集管试剂盒中已经备有)，轻柔地盖上管盖，12000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，倒掉废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

6. 向吸附柱CR1中加入350 μ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400 \times g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

7. DNase I 工作液的配制：取10 μ l DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70 μ l RDD溶液，轻柔混匀。

8. 向吸附柱CR1中央加入80 μ l的DNase I 工作液，室温放置15 min。

9. 向吸附柱CR1中加入350 μ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400 \times g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

10. 向吸附柱CR1中加入500 μl 漂洗液RW (使用前请先检查是否已加入乙醇)，室温静置2 min，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

11. 重复步骤10。

12. 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR1置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CR1在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验。

13. 将吸附柱CR1放入一个新的RNase-Free离心管（试剂盒中已备用）中，向膜中央加入14 μl RNase-Free ddH₂O，轻柔地盖上管盖，室温放置2 min。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心1min，所得溶液即为RNA溶液。

注意：洗脱体积不得少于10 μl ，可用减小洗脱体积的方法得到较高浓度的RNA，但是这将影响总的RNA得率。

二 从福尔马林固定的微切割样品中提取总RNA

以下操作步骤适用于从福尔马林固定的微切割样品中提取总RNA。

在从福尔马林固定的微切割样品中提取RNA时，主要的影响因素有：样品的新旧程度、固定的过程和样品的储存条件。RNA可能会降解成<300bp的片段，而本试剂盒能有效吸附>200bp的片段，所以如果样品中的RNA高度降解，可能会出现提不出RNA的情况。

1. 预先加热水浴至55°C，为第5步中的蛋白酶K（客户自备，目录号：RT403）消化做准备。
2. 向样品中加入适当体积的裂解液RL（使用前请向RL中加入β-巯基乙醇，终浓度1%），加入裂解液RL体积与微切割仪器的容积有关，但不能超过140 μl。
3. 如果需要，可以将样品和裂解液RL转移至1.5 ml或2 ml的RNase-Free的离心管中（客户自备）。补充裂解液RL至体积为150 μl。

注意：当处理的细胞量小于5000时，向溶液中加入20 ng Carrier RNA（5 μl 4 ng/μl Carrier RNA工作液），Carrier RNA工作溶液的配制请见第4页溶液配制说明。

4. 向溶液中加入295 μl RNase-Free ddH₂O，然后加入5 μl蛋白酶K溶液(浓度20 mg /ml，客户自备)，用移液器混匀，55°C 孵育10 min。室温12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心3 min。

注意：此时的组织碎片可能会形成小球，有时在溶液上面会浮有一层薄膜。

5. 用移液器将上层溶液（450 μl左右）转移至一个新的RNase-Free离心管中（客户自备）。

注意：使用移液器吸取上层溶液时，一定要避免接触到组织碎片小球，而且枪头要伸到薄膜以下进行吸取，避免将薄膜转移至离心管中。

6. 向吸出的上层溶液中加入0.5倍体积的无水乙醇（通常为225 μl），用移液器混匀。

注意：在加入乙醇后，溶液中可能会出现沉淀，但是不会影响RNA的提取。

7. 将所有溶液及沉淀全部转移至吸附柱CR1上（吸附柱CR1放在2 ml收集管中，此收集管试剂盒已经备有），轻柔地盖上管盖，12,000 rpm (~13,400 ×g)离心30-60 sec，倒掉废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

-
8. 向吸附柱CR1中加入350 μl 去蛋白液RW1, 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR1放回收集管中。
 9. DNase I 工作液的配制: 取10 μl DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中, 加入70 μl RDD溶液, 轻柔混匀。
 10. 向吸附柱CR1中央加入80 μl 的DNase I 工作液, 室温放置15 min。
 11. 向吸附柱CR1中加入350 μl 去蛋白液RW1, 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR1放回收集管中。
 12. 向吸附柱CR1中加入500 μl 漂洗液RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 室温静置2 min, 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR1放回收集管中。
 13. 重复步骤12。
 14. 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min, 倒掉废液。将吸附柱CR1置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
注意: 此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 离心后将吸附柱CR1在室温放置片刻, 以充分晾干。如果有漂洗液残留, 可能会影响后续的RT等实验。
 15. 将吸附柱CR1放入一个新的1.5 ml RNase-Free离心管中(试剂盒中已备有), 向膜中央加入14 μl RNase-Free ddH₂O, 轻柔地盖上管盖, 室温放置2 min。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心1 min, 所得溶液即为RNA溶液。
注意: 洗脱体积不得少于10 μl , 可用减小洗脱体积的方法得到较高浓度的RNA, 但是这将影响总的RNA得率。

三 从动物组织中提取总RNA

以下操作适用于从大多数动物组织中提取RNA，如果要从纤维组织中提取RNA，请看第11页。从动物组织中提取RNA，若要得到高纯度和高产量的RNA，组织的起始量非常重要，本试剂盒提供的吸附柱CR1最大结合能力为45 µg，裂解液最多能裂解5 mg的组织。有些组织像脾脏、部分脑组织、肺组织和胸腺组织在提取的过程中有可能会形成一些沉淀，但不会影响RNA的提取。

推荐使用的组织量不超过5 mg，请不要超过吸附柱CR1的载量，否则将会降低RNA的产量和纯度。

1. 确定组织的总量，不要超过5 mg，立即进行第2步。
2. 在裂解液RL(使用前请加入β-巯基乙醇，终浓度为1%)中将组织块切碎和匀浆（请见步骤2a, 2b）

注意：组织块的切碎和匀浆过程可采用下列2a和2b两种方法之一，当处理小于10 µg的组织时，需要向裂解液中加入20 ng Carrier RNA工作溶液（5 µl 4 ng/µl），Carrier RNA工作溶液的配制请见第4页溶液的配制说明。匀浆不彻底将导致RNA提取量低，还可能导致堵塞吸附柱CR11的现象发生。

2a 使用匀浆器进行匀浆：

将称重过的组织块放在一个大小合适的容器中，加入350 µl裂解液RL，立即进行匀浆至均一溶液（通常为20-40 sec），继续步骤3。

2b 使用研磨杵（客户自备，目录号：HC205）进行研磨：

在1.5 ml RNase-Free的离心管中（客户自备）加入350 µl裂解液RL，将组织块迅速从-80°C转入这个离心管中，用研磨杵充分研磨，彻底将组织破碎，注意避免组织冻融。将此溶液移至过滤柱CS（客户自备，订购信息见第1页）上(过滤柱CS放在收集管中)，12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，收集滤液，继续步骤3。

3. 将匀浆好的样品（2a）或者过滤液（2b）以12,000 rpm (~13,400×g)离心3 min，用移液器仔细将上清液转移到新的1.5 ml RNase-Free离心管中（客户自备）。
4. 向上清中加入1倍体积(350 µl)70%乙醇，用移液器混匀，立即进行第5步。

注意：如果在以上过程中损失了一些裂解液，70%乙醇的加量也要相应减小。在乙醇加入后，溶液中可能会出现沉淀，但不会影响RNA的提取。

-
5. 将所有溶液及沉淀全部转移至吸附柱CR1上（吸附柱CR1放在2 ml收集管中，试剂盒中已备有），轻柔地盖上管盖，12,000 rpm (~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉废液，将吸附柱CR1放回收集管中。
 6. 向吸附柱CR1中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。
 7. DNase I 工作液的配制：取10 μl DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀。
 8. 向吸附柱CR1中央加入80 μl的DNase I 工作液，室温放置15 min。
 9. 向吸附柱CR1中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。
 10. 向吸附柱CR1中加入500 μl 漂洗液RW （使用前请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。
 11. 重复步骤10。
 12. 12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR1置于室温放置数 min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CR1在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验。

13. 将吸附柱CR1放入一个新的 RNase-Free离心管中（试剂盒中已备有），向膜中央加入14 μl RNase-Free ddH₂O，轻柔地盖上管盖，室温放置2 min。12,000 rpm (~13,400×g)离心1 min，所得溶液即为RNA溶液。

注意：洗脱体积不得少于10 μl，可用减小洗脱体积的方法得到较高浓度的RNA，但是这将影响总的RNA得率。

四 从纤维组织中提取总RNA

纤维组织，例如骨骼肌、心脏、皮肤中含有大量的收缩蛋白、连接组织和胶原质，只有去除这些蛋白质，才能使RNA的提取顺利进行。所以在从纤维组织中提取总RNA时，引入了蛋白酶K消化这一过程。

采用以下操作，可成功地从心脏、肌肉和皮肤组织中提取RNA，其他富含蛋白质的组织也可采用此方法进行RNA的提取，值得注意的是，在进行蛋白酶K消化过程中的缓冲液不能对RNase进行长期有效的抑制，因而此方法不适用于含有丰富RNase的脾脏和肠组织等RNA的提取。

推荐使用的组织量不超过5 mg，请不要超过吸附柱CR1的载量，否则将会降低RNA的产量和纯度。

1. 预先加热水浴至55°C，为第5步中的蛋白酶K（客户自备，目录号：RT403）消化做准备。
2. 确定组织的总量，不要超过5 mg，立即进行第3步。
3. 在裂解液RL（使用前请加入β-巯基乙醇，终浓度为1%）中将组织块匀浆（3a）或者研碎（3b）。

注意：当处理小于10 μg的组织时，需要向裂解液中加入20 ng Carrier RNA 工作液(5 μl 4 ng/μl溶液)，Carrier RNA溶液的配制请见第4页溶液的配制说明。匀浆不彻底会导致RNA提取量低，还可能导致吸附柱CR1堵塞。采用匀浆器或过滤柱进行匀浆，会比采用其他方式匀浆获得更高的RNA得率。

3a 使用匀浆器进行匀浆：

将称重过的组织块放在一个大小合适的容器中，加入150 μl裂解液RL，立即进行匀浆至均一溶液（通常时间为20-40 sec），继续步骤4。

3b 使用研磨杵（客户自备，目录号：HC205）进行研磨：

在1.5 ml RNase-Free的离心管中（客户自备）加入150 μl裂解液RL，将组织块迅速从-80°C转入这个离心管中，用研磨杵充分研磨，彻底将组织研碎，**注意避免组织冻融，继续步骤4。**

注意：当使用研磨杵研磨时，请务必将组织彻底研碎，以保证裂解充分。

-
4. 向溶液中加入295 μl RNase-Free ddH₂O，然后加入5 μl 蛋白酶K溶液（浓度为20 mg / ml，客户自备，目录号：RT403），用移液器混匀。55°C 孵育10 min。室温12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心3 min。

注意：此时的组织碎片可能会形成小球，有时在溶液上面会浮有一层薄膜。

5. 用移液器将上层溶液（通常450 μl 左右）转移至一个新的1.5 ml RNase-Free的离心管中（客户自备）。

注意：使用移液器吸取上层溶液时，一定要避免接触到组织碎片小球，而且枪头要伸到薄膜以下进行吸取，避免将薄膜转移至离心管中。

6. 向吸出的上层溶液加入0.5倍体积的无水乙醇（通常为225 μl ），用移液器混匀。

注意：在乙醇加入后，溶液中可能会出现沉淀，但是不会影响RNA的提取。

7. 将所有溶液及沉淀物质全部转移至吸附柱CR1上（吸附柱CR1放在2 ml收集管中，试剂盒已经备有），轻柔地盖上管子，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30-60 sec，倒掉废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

8. 向吸附柱CR1中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400 \times g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

9. DNase I 工作液的配制：取10 μl DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀。

10. 向吸附柱CR1中央加入80 μl 的DNase I 工作液，室温放置15 min。

11. 向吸附柱CR1中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400 \times g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

12. 向吸附柱CR1中加入500 μl 漂洗液RW（使用前请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，12,000 rpm(~13,400 \times g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

13. 重复步骤12。

14. 12,000 rpm(~13,400 \times g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR1置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CR1在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验。

15. 附柱CR1放入一个新的RNase-Free离心管（试剂盒中已备用）中，向膜中央加入14 μ l RNase-Free ddH₂O，轻柔地盖上管盖，室温放置2 min。12,000 rpm (~13,400 \times g)离心1 min，所得溶液即为RNA溶液。

注意：洗脱体积不得少于10 μ l，可用减小洗脱体积的方法得到较高浓度的RNA，但是这将影响总的RNA得率。

五 从动物细胞中提取总RNA

从动物细胞中提取RNA，若要得到高纯度和最佳产量的RNA，细胞的起始量非常重要，本试剂盒提供的吸附柱CR1最大结合能力为45 µg，而裂解液最多能裂解 5×10^5 的细胞。推荐使用的细胞量不超过 5×10^5 ，请不要超过吸附柱CR1的载量，否则将会降低RNA的产量和纯度。

1. 细胞的处理和裂解

1a 细胞沉淀：轻弹管底使细胞分开，加入350 µl裂解液RL（使用前请加入β-巯基乙醇，终浓度为1%），涡旋振荡或用移液器混匀，继续步骤2。

1b 悬浮培养细胞：确定细胞的数量（见表2），在RNase-Free的离心管（客户自备）中300×g离心5 min沉淀细胞，去除所有上清，加入350 µl裂解液RL（使用前请加入β-巯基乙醇，终浓度为1%），继续步骤2。

1c 单层贴壁细胞：对于该种细胞的收集可直接在细胞培养器皿中进行（直径最大为10 cm），或者可以先用胰蛋白酶消化，再收集细胞沉淀，进行裂解。

直接在细胞培养器皿中进行裂解：

确定细胞数量，将细胞培养基完全吸出，加入350 µl裂解液RL（使用前请加入β-巯基乙醇，终浓度为1%）裂解细胞，收集细胞裂解液并将其转移至1.5 ml RNase-Free离心管（客户自备）中，涡旋振荡或用移液器混匀，确保看不见任何成团的细胞之后，继续步骤2。

胰蛋白酶消化(摇瓶中培养的单层贴壁细胞，通常采用胰蛋白酶消化的方法)：

确定细胞数量，吸出培养基，用PBS缓冲液冲洗细胞，吸除PBS缓冲液，加入含有0.10-0.25%胰蛋白酶的PBS缓冲液处理细胞，在细胞脱离容器壁后，加入含有血清的溶液使胰蛋白酶失活，将细胞转移到RNase-Free的离心管中，300×g离心5 min沉淀细胞，仔细去除所有上清。加入350 µl裂解液RL（使用前请加入β-巯基乙醇，终浓度1%）裂解细胞。继续步骤2

注意1：如果细胞培养基没有去除干净，将会稀释裂解液，影响裂解效果及RNA与硅胶树脂膜的结合，这将导致RNA的提取量降低。

注意2：当处理的细胞量 $\leq 1 \times 10^5$ 时，裂解液RL的加量可以减少至75 µl，这时可采用小一些的离心管，涡旋振荡1 min使裂解液匀质化，进行步骤3。

注意3：如果处理细胞量 < 5000 时，需要向裂解液中加入20 ng Carrier RNA (5 µl 4 ng/µl 溶液)，Carrier RNA溶液的配制请见第四页溶液配制说明。

注意4：如果细胞重悬不完全，将会导致裂解不充分，降低RNA的产率。

2. 样品的匀质化（请见步骤2a, 2b）

注意：匀质不彻底将导致RNA提取量低，还可能导致吸附柱CR1堵塞，采用匀浆器或过滤柱进行匀质，会比采用其他方式匀浆获得更高的RNA得率。

2a 将加入裂解液的细胞转移至过滤柱CS（客户自备，订购信息见第1页）上（过滤柱CS放在收集管中），12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，收集滤液，继续步骤3。

2b 使用匀浆器匀浆30 sec。

3. 加入1倍体积（通常为350 μl）70%乙醇，用移液器混匀，立即进行第4步。

注意：如果在匀质的过程中损失了一些裂解液，70%乙醇的加量也要相应减小。如果在第2步中只加入了75 μl的裂解液RL，则在本步骤中也只需加入75 μl的70%乙醇，加入乙醇后，溶液中可能会出现沉淀，但是不会影响RNA的提取。

4. 将所有溶液及沉淀全部转移至吸附柱CR1上（吸附柱CR1放在2 ml RNase-Free的收集管中，此收集管试剂盒中已经备有），轻柔地盖上管盖，12,000 rpm (~13,400×g)离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

5. 向吸附柱CR1中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm (~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

6. DNase I 工作液的配制：取10 μl DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀。

7. 向吸附柱CR1中央加入80 μl的DNase I 工作液，室温放置15 min。

8. 向吸附柱CR1中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm (~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

9. 向吸附柱CR1中加入500 μl漂洗液RW（**使用前请先检查是否已加入乙醇**），室温静置2 min，12,000 rpm (~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR1放回收集管中。

10. 重复步骤9。

11. 12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR1置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CR1在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验。

12.将吸附柱CR1放入一个新的RNase-Free离心管（本试剂盒中已经备有）中，向膜中央加入14 μl RNase-Free ddH₂O，轻柔地盖上管盖，室温放置2 min。12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心1 min，所得溶液即为 RNA溶液。

注意：洗脱体积不得少于10 μl ，可用减小洗脱体积的方法得到较高浓度的RNA，但是这将影响总的RNA得率。