

## 动物组织/血液/细胞 RNA 提取试剂盒

( 离心柱法 )

产品编号	规格
Sup151603	50 次
Sup151604	100 次

### 产品简介

本试剂盒是基于 TRizol 改进后的柱式总 RNA 提取试剂盒，裂解液充分裂解并匀质化样本，采用独特的硅基质膜吸附技术，通过离心吸附柱在高盐状态下高效专一的结合溶液中的 RNA，同时最大限度的有效除去蛋白质、无机盐离子及有机杂质等；可从动物组织、植物材料、各种微生物及培养细胞等样品中快速提取总 RNA，每次可处理 30-50 mg 组织或  $5 \times 10^6$  细胞，可同时处理多个不同样品。本试剂盒提取得到的 RNA 可直接应用于 RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译等实验。

## 一、试剂盒组成、储存条件

试剂盒组成	保存	Sup151603	Sup151604
裂解液(TRizol plus)	2-8°C避光储存	50 mL/瓶×1 瓶	100mL/瓶×1 瓶
漂洗液	室温	18mL /瓶×1 瓶	18mL /瓶×2 瓶
DEPC 水	室温	5 mL /瓶×1 瓶	5 mL /瓶×1 瓶
离心柱	室温	50 个	100 个
说明书	室温	1 份	1 份

本试剂盒室温下保存 12 个月不影响使用效果。收到试剂盒后请将裂解液 ( TRizol plus ) 放置在 2-8°C，避光储存。自备试剂：氯仿(新开封或提取 RNA 专用)、70%乙醇(无 RNase 水配制)、无水乙醇。

## 二、产品特点

- 纯度高：最大限度除去蛋白质等杂质，提取的 RNA 可直接用于下游各种实验。
- 提取量大：独特的裂解液配方，充分裂解细胞或组织，RNA 提取量多至 100 µg。
- 快速：步骤少，操作简单，节省时间。
- 兼容性强：适用于多种动植物组织和细胞 RNA 的提取。

## 三、实验前准备及注意事项

1. 第一次使用前应按照试剂瓶标签说明，在使用前，请按下表准确加入 98-100%的乙醇。

	50T	100T
漂洗液	18ml	18ml×2
乙醇	42ml	42ml×2

1. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：

1) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头，避免交叉污染。

2) 玻璃器皿应在使用前于 180°C 高温下干烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10min，用水彻底冲洗后高压灭菌。

3) 配制溶液应使用无 RNase 的水。

4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。

2. 样品应避免反复冻融，否则影响 RNA 提取得率和质量。

3. 使用前若发现裂解液 TRizol plus 有沉淀，可置于 56°C 水浴几分钟，即可溶解。

4. 所有离心步骤若无特殊说明均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。

5. 若下游实验对 DNA 非常敏感，建议用不含 RNase 的 DNase I 对 RNA 进行处理。

## 四、操作步骤

使用前请先在**漂洗液**中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

### 1. 样品处理

1a.植物组织：取新鲜植物组织在液氮中充分研磨或将植物组织剪碎后直接在**裂解液 (TRizol plus)** 中迅速研磨，每 **30-50 mg** 组织加入 **1 ml 裂解液 (TRizol plus)**，混匀。

**注意：样品体积一般不要超过裂解液 (TRizol plus) 体积的 10%。**

1b.动物组织：取新鲜或-70℃冻存的动物组织尽量剪碎，每 30-50 mg 组织加入 1 ml 裂解液 (TRizol plus)，匀浆仪进行匀浆处理。或在液氮中研磨后加入裂解液 (TRizol plus) 1ml 混匀。

**注意：样品体积一般不要超过裂解液 (TRizol plus) 体积的 10%。**

1c.单层培养细胞：吸去培养液，可直接在培养板中加入适量裂解液 (TRizol plus) (每 10 cm<sup>2</sup> 面积需要 1 ml 裂解液 (TRizol plus))，用取样器反复吹打使细胞裂解。也可用胰蛋白酶处理后，将细胞溶液转移至 RNase-Free 的离心管中，300×g 离心 5 min，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清，加入裂解液 (TRizol plus) 1 ml 混匀。

**注意：1) 收集细胞数量不要超过  $1 \times 10^7$ 。**

**2) 裂解液 (TRizol plus) 加量根据培养板面积决定，不是由细胞数决定。如果裂解液 (TRizol plus) 加量不足，可能导致提取的 RNA 中有 DNA 污染。**

**3) 收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净，否则会导致裂解不完全，造成 RNA 的产量降低。**

1d.细胞悬液：离心收集细胞。每  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  动物、植物和酵母细胞或每  $10^7$  细菌细胞加入 **1 ml 裂解液 (TRizol plus)**。

**注意：1) 加入裂解液 (TRizol plus) 前不要洗涤细胞，以免 RNA 降解。**

**2) 一些酵母和细菌细胞可能需要匀浆仪或液氮研磨处理。**

1e.血液处理：直接取新鲜的血液，加入 3 倍体积的裂解液 (TRizol plus) (推荐 0.25 ml 全血加入 0.75 ml 裂解液 (TRizol plus)) 和 20μl 冰醋酸，充分振荡混匀。

1f.可选步骤：对于蛋白、脂肪、多糖或胞外物质含量高的样品，如肌肉组织、脂肪组织或植物的块茎，可以在匀浆处理后 4℃，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 10min 以除去不溶物质，此时沉淀中含胞外物质、多糖和高分子量的 DNA，而 RNA 存在于上清中。

2. 样品中加入**裂解液 (TRizol plus)** 后反复吹打几次，使样本充分裂解。室温放置 5~10min，使蛋白核酸复合物完全分离。

3. 以每 **1 ml 裂解液 (TRizol plus)** 加入 **200 μl 氯仿** 的比例加入氯仿，盖好管盖，涡旋震荡 20sec，静置 5min。

4. 4℃ 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 10min，此时样品分为三层：红色有机相，中间层和上层无色水相，RNA 主要在上层水相中，将上层水相移到一个新的 RNase-Free 离心管(自备) 中。

5. 在得到的水相溶液中加入等体积的 70%乙醇(无 RNase 水配制)，颠倒混匀；

6. 将上步所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱中。静置 1min，若一次不能加完溶液，



可分多次转入。12000rpm 离心 20 秒，倒掉离心管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中；

7. 向吸附柱中加入 600  $\mu$ l 漂洗液（使用前检查是否已加入无水乙醇），12000rpm 离心 20 秒，倒掉离心管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中；

8. 重复步骤 7。

9. 12000rpm 离心 2 分钟，倒掉收集管中废液。将离心柱室温静置 2~3min 使得乙醇挥发干净。

**注意：**这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续酶促反应（酶切、PCR 等）。

10. 将吸附柱置于一个无 RNase 离心管中，向吸附柱中央位置加入 30-50  $\mu$ l RNase-Free Water，室温放置 1min，12000rpm 离心 1 分钟，收集 RNA 溶液，-70°C 保存 RNA，防止降解。

**注意：**1) RNase-Free Water 体积不应小于 30  $\mu$ l，体积过小影响回收率。

2) 如果要提高 RNA 的产量，可用 30-50  $\mu$ l 新的 RNase-Free Water 重复步骤 11。

3) 如果要提高 RNA 浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤 11

## 问题指南

得率低	A .样品裂解或匀浆处理不彻底。 B .最后得到的RNA沉淀未完全溶解。
A260/280<1.65	<p>A . 检测吸光度时，RNA样品不是溶于TE，而是溶于水。 低离子浓度和低pH条件下，A280值会较高。</p> <p>B . 样品匀浆时加的试剂量太少。</p> <p>C . 匀浆后样品未在室温放置5 min</p> <p>D . 水相中混有有机相。</p> <p>E . 最后得到的RNA沉淀未完全溶解。</p>
RNA降解	<p>A . 组织取出后没有马上处理或冷冻。</p> <p>B . 样品或提取的RNA沉淀保存于-5- -20°C，未在-60- -70°C保存。</p> <p>C . 细胞在胰蛋白酶处理时被破坏。</p> <p>D . 溶液或离心管未经RNase去除处理。</p> <p>E . 电泳时使用的甲酰胺pH低于3.5。</p>
DNA污染	<p>A . 样品匀浆时加的试剂体积太少。</p> <p>B . 样品中含有组织溶剂(如乙醇，DMSO等)，强缓冲液或碱性溶液。</p>
蛋白和多糖污染	<p>A . 样品中蛋白、多糖含量高。</p> <p>B . 样品量太大。</p> <p>C . 水相中混有有机相。</p>