



# Trigol plus

## 产品简介:

Trigol plus RNA 提取分离试剂用于一步或分步提取分离总 RNA 或小 RNA 和大 RNA, 适用于来源于动物、植物、酵母菌、细菌、病毒等细胞、组织和液体样本, 提取步骤中省去氯仿分层过程, 能有效去除 DNA、多糖和蛋白等杂质污染, 保持很好的 RNA 分子的完整性。该试剂提取的 RNA 可直接用于 qRT-PCR、RNase 保护实验、Northern blot、Dot blot、polyA 筛选等常规分子生物学实验。

## 产品组成及储存:

编号	成分	规格	储存条件
NEP0119-1	Trigol plus	50 ml	2-8℃避光保存
NEP0119-2	Trigol plus	100 ml	2-8℃避光保存

## 实验前准备:

耗材: RNase-free 枪头, RNase-free 离心管。

试剂: RNase free ddH<sub>2</sub>O, RNase free ddH<sub>2</sub>O 配制的 80%乙醇, RNase free ddH<sub>2</sub>O 配制的 70%异丙醇, 异丙醇, 4-溴苯甲醚 (可选用)。

## 步骤:

### 一、样本处理:

1、动物组织: 按 30~100 mg 组织加 1ml Trigol plus, 组织体积不能超过 Trigol plus 体积的 10%, 否则匀浆效果会不好, 采用玻璃或电动匀浆器充分匀浆约需 1~2 min。

**注: 对于 DNA 含量高的组织 (如脾脏), 建议按 30~50mg 组织加 1ml Trigol plus。对于富含脂肪的组织, 匀浆组织后, 12,000rpm 离心 5 分钟, 离心后可以在上层看到油脂层, 用移液枪头穿刺过油脂层, 将上清转移到新离心管中。**

2、植物组织: 按 30~100 mg 组织加 1ml Trigol plus, 将组织直接放入研钵中, 加入液氮, 迅速研磨。

**注: 对于 DNA 含量高的组织, 建议按 30~50 mg 组织加 1ml Trigol plus。**

3、贴壁细胞: PBS 漂洗贴壁细胞一次, 每 10cm<sup>2</sup> 生长的贴壁细胞中加入 1ml Trigol plus, 使裂解液均匀浸润细胞, 用移液器反复吹打细胞使其脱离培养皿或培养瓶至裂解液中无明显沉淀。

4、悬浮细胞: 1000rpm 离心 10 分钟, 弃上清, 每 5-10x10<sup>6</sup> 细胞加入 1ml Trigol plus 使用移液器反复吹打细胞至裂解液中无明显沉淀。

5、菌液: rpm 离心 2 分钟, 弃上清, 每 ≤2x10<sup>9</sup> 细胞加入 1ml Trigol plus 使用移液器反复吹打至裂解液中无明显沉淀。

6、血液: 每 200μl 抗凝新鲜全血加入 1ml Trigol plus 使用移液器充分吹打混匀。

**注: 此时可放入 -70℃ 长期保持。**

### 二、RNA 提取:

#### 一) 两步法分离小 RNA 和大 RNA

##### 1、沉淀杂质:

a) 每 1ml Trigol plus 加入 400 μl RNase free 水, 剧烈振荡 15sec, 室温放置 15 min。

b) 12,000rpm 离心 15 min。离心管底层半固态沉淀含 DNA, 蛋白和多糖等杂质, RNA 在上清中。

##### 2、沉淀大 RNA:

a) 吸取 1ml 上清至一干净灭菌的 RNase free 的离心管中, 舍弃沉淀上层上清。



- b) 加入 400 $\mu$ l 75%乙醇，混匀后室温放置 10min。  
c) 12,000rpm 离心 10 分钟，离心管底部白色沉淀即为大 RNA，转移包含小 RNA 的上清至一干净灭菌的 RNase free 的离心管中。

### 3、沉淀小 RNA:

- a) 加入 0.8 倍体积的异丙醇（大约 1.4ml）至包含小 RNA 的上清中，混匀后 4 $^{\circ}$ C 放置 30min。  
b) 12,000rpm 离心 15 min，离心管底部白色沉淀即为小 RNA，弃去上清。

### 4、漂洗杂质:

- a) 对于大 RNA 沉淀，每 1ml 上清产生的沉淀，加入 500 $\mu$ l 75%乙醇漂洗沉淀，12,000rpm 离心 3min，用移液器弃去乙醇，重复漂洗一次。

**注：不要干燥沉淀，否则导致 RNA 溶解度下降。**

- b) 于小 RNA 沉淀，每 1ml 上清产生的沉淀，加入 500 $\mu$ l 70%异丙醇漂洗沉淀，12,000rpm 离心 3min，用移液器弃去异丙醇，重复漂洗一次。

- c) 室温晾干沉淀 1-2min。

**注：不要过度干燥沉淀，否则导致 RNA 溶解度下降。**

### 5、RNA 溶解

- a) 用适量的 RNase-free water 溶解 RNA 沉淀，使大 RNA 浓度在 1-2 $\mu$ g/ $\mu$ l 之间，小 RNA 浓度大约在 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l。  
b) 室温涡旋 2-5min，使 RNA 充分溶解。

**注：采用分光光度计精确测定 RNA 的浓度，需要使用 RNase-free water，1mM NaOH 或 pH>8 的缓冲液稀释样本测定。**

- c) 将 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

## 二) 一步法分离总 RNA

### 1、沉淀杂质:

- a) 每 1ml Trigol plus 加入 400  $\mu$ l RNase free 水，剧烈振荡 15sec，室温放置 15 min。

**注：禁用涡流振荡器，以免基因组 DNA 断裂；样品若蛋白含量较高，可重复抽提一次。**

- b) 12,000rpm 离心 15 min。离心管底层半固态沉淀含 DNA，蛋白和多糖等杂质，RNA 在上清中。

- c) 吸取 1ml 上清至一干净灭菌的 RNase free 的离心管中，舍弃沉淀上层上清。

### 2、相分离（可选步骤）

**注：对于富含 DNA 或胞外杂质的样本，相分离有用。**

- a) 加入 5 $\mu$ l 4-溴苯甲醚于 1ml 上清，混匀 15s，室温放置 3-5min。

- b) 12,000rpm 离心 10 min，残留的 DNA，蛋白和多糖等杂质在离心管底部的有机相中，RNA 在上清中。

### 3、沉淀总 RNA:

- 1) 加入 800 $\mu$ l 异丙醇至 1ml 上清（步骤 2 或步骤 3），混匀后室温放置 10min。

- 2) 12,000rpm 离心 10min，离心管底部白色沉淀即为总 RNA，弃去上清。

### 4、漂洗杂质:

- 1) 每 1ml 上清产生的沉淀，加入 500 $\mu$ l 75%乙醇漂洗沉淀，12000rpm 离心 3 分钟，用移液器弃去乙醇。

- 2) 重复漂洗一次。

- 3) 室温晾干沉淀 1-2 分钟。

**注：不要过度干燥沉淀，否则导致 RNA 溶解度下降。**

### 5、RNA 溶解

- 1) 用适量的 RNase-free water 溶解 RNA 沉淀，使总 RNA 浓度在 1-2 $\mu$ g/ $\mu$ l 之间。

- 2) 室温涡旋 2-5min，使 RNA 充分溶解。



注：采用分光光度计精确测定 RNA 的浓度，需要使用 RNase-free water, 1mM NaOH 或 pH>8 的缓冲液稀释样本测定。

3) 将 RNA 保存于-80℃冰箱。

#### 提取效果检测：

- 1、提取后得到的 RNA 可用琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度计检测浓度和纯度。
- 2、RNA 在 260nm 处有吸收峰，检测时应该使 OD260 值在 0.1 到 1.0 之间数值较准确。
- 3、核酸浓度 (μg/ml) = OD260×40×稀释倍数。
- 4、OD260/OD280 的值应该为 1.7-2.0。

#### 常见问题分析：

常见问题	可能原因	建议
RNA 降解	溶液、枪头和离心管未去除 RNase, 或被 RNase 污染	溶液使用 RNase-free 水配制, 枪头和离心管必须去除 RNase。操作过程中必须戴手套可口罩, 防止 RNase 污染
	材料过多	材料量与 Trigo plus 量要在说明书范围内
	样品未保存在-80℃	材料用完立即液氮速冻, 保存于-80℃
	材料取出后未立即处理或冷冻	材料取出后应立即处理
	电泳缓冲液 pH 过高	确保待测样品电泳时使用新鲜缓冲液
	蛋白污染	可用氯仿抽提时多抽提一次, 吸液时勿将中间固相吸入
	样品过少, 浓度过低	加大样品用量
RNA 提取量少	研磨不充分	研磨时要充分研磨
DNA 污染	样品中含有强碱性物质	适当加入 3mol/L 醋酸钠 (pH5.2, RNase-free)
	吸液时将中间层吸入	吸液时要小心, 不要吸得过多, 将中间层吸入
蛋白、多糖污染	材料中蛋白、多糖含量高	用氯仿多抽提一次
	洗液时将中间固相吸入	洗液时小心, 勿将中间相吸入, 若吸入, 可用氯仿再抽提一次