

离心柱型总 RNA 提取试剂盒

Cat #: GV-MN-RNA-50

产品规格: 50T

TRNAzol 总 RNA 提取试剂盒是针对次生物质含量较少的植物组织和动物组织 RNA 提取产品, 具有更强的裂解能力, 配合硅基质离心柱能有效去除蛋白污染, 保持很好的 RNA 分子的完整性。试剂盒提取的 RNA 可直接用于 Northern blot、Dot blot、poyA 筛选等常规分子生物学实验。

一、产品组成及储存

成分	规格	注意事项
TRNAzol	50ml	4℃保存,一年有效
Buffer WR1	24ml	使用前需加 6ml 无水乙醇
Buffer WR2	16ml	使用前需加 64ml 无水乙醇
RNase free water	20ml	
RNase free 吸附柱	50	
RNase free 离心管	50	
RNase free 收集管	50	

二、注意事项

- 1、TRNAzol 可有效防止 RNA 降解, 但是在后续实验中, 离心管, 枪头及相关溶液都必须无 RNA 酶污染。耐高温器物可 150℃ 烘烤 4 小时以去除 RNA 酶, 其它器物去除 RNA 酶可用 0.5M NaOH 浸泡 10min 或用 0.01% 的 DEPC 水浸泡过夜, 然后灭菌, 烘干。其他所需试剂需用 DEPC 水配制。
- 2、使用冻存的细胞或组织抽提总 RNA 的效果通常比新鲜的细胞或组织差一些。因为在细胞或组织冻融过程中一些细胞或组织内的 RNase 会被释放出来。如果不能及时抽提 RNA, 推荐先加入适量 TRNAzol, 裂解样品后冻存。
- 3、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

三、产品特点

- 1、快速高效: 一小时内完成提取, 提取的 RNA 纯度高。
- 2、分层可视: 裂解液含红色指示剂, 便于分层。
- 3、应用广泛: 可以提取动物、植物、细胞、细菌等多种样本, 提取的 RNA 应用范围广泛。

四、实验前试剂准备

- 1、耗材准备: RNase-free 枪头, 1.5ml RNase-free 离心管。
- 2、试剂准备: 三氯甲烷, 无水乙醇。
- 3、仪器准备: 请提前将低温离心机调至 4℃

操作步骤:

(一)样本处理:

- 1、动物组织: 30-100mg 组织加 1ml TRNAzol, 组织体积不能超过 TRNAzol 体积的 10%, 否则匀浆效果不好, 采用玻璃或电动匀浆器充分匀浆约需 1-2 min。
- 2、植物组织:按 30~100 mg 组织加 1ml TRNAzol, 将组织直接放入研钵中, 加入液氮, 迅速研磨。
- 3、贴壁细胞: PBS 漂洗贴壁细胞一次, 每 10cm² 生长的贴壁细胞中加入 1ml TRNAzol, 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 5-10x10⁶ 细胞加入 1mlTRNAzol 使用移液器反复吹打细胞至裂解液中无明显沉淀。
- 5、菌液: 8000 rpm 离心 2 分钟, 弃上清, 每 2x10⁹ 细胞加入 1mlTRNAzol 使用移液器反复吹打至裂解液中无明显沉淀。
- 6、血液: 每 200 μ l 抗凝新鲜全血加入 1ml TRNAzol 使用移液器充分吹打混匀。

(二)提取步骤

- 1、样本加入 TRNAzol 后, 室温放置 5~10 min, 使其充分裂解。
注: 此时可放入 -80 $^{\circ}$ C 长期保持。
- 2、每 1ml TRNAzol 加入 200 μ l 氯仿, 振荡 15s, 室温放置 5 min。
注: 禁用漩涡振荡器, 以免基因组 DNA 断裂; 样品若蛋白含量较高, 可重复抽提一次。
- 3、4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 15 min。此时溶液会分成三层: 无色的水相 (上层), 中间层和粉红色的有机相, RNA 主要在水相中, 水相体积约为所用 TRNAzol 试剂的 50%。
- 4、吸取上层水相 (1mlTRNAzol 处理的样本至少可以吸取 400 μ l 水相), 至一干净灭菌的 RNase free 的离心管中。
注: 为了避免吸到中间层导致 DNA 污染, 可以适当弃去部分水相。
- 5、每 400 μ l 水相加入 150 μ l 无水乙醇 (此时可能会出现沉淀), 轻轻颠倒混匀, 12000 rpm 瞬时离心使管盖的溶液和沉淀回收到离心管中。
- 6、将以上的溶液和沉淀加入离心柱中, 12000 rpm 离心 1min, 将溶液再次加入到同一个离心柱中, 12000 rpm 离心 1min, 弃废液。
- 7、向离心柱中加入 500 μ l Buffer WR1 (使用前加入无水乙醇), 12000 rpm 离心 1min, 弃废液。
- 8、向离心柱中加入 700 μ l Buffer WR2 (使用前加入无水乙醇), 12000 rpm 离心 1min, 弃废液。
- 9、重复操作步骤 8。
- 10、12000 rpm 离心 2min, 室温放置 5min, 彻底去除残余液体。
- 11、将离心柱转入一个新的 1.5 ml RNase free 离心管中, 加 30-100 μ l RNase-Free ddH₂O, 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 2 min, 洗脱 RNA。
注: 为获得更多 RNA, 建议重复步骤 11 进行二次洗脱。

六、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 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $\text{OD}260 \times 40 \times$ 稀释倍数。
- 4、OD260/OD280 的值应该为 1.7-2.0。

七、常见问题分析及处理方法

1、RNA 降解。

- 1) 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和口罩，防止 RNase 污染。
- 2) 材料过多：材料量与 TRNAzol 量要在说明书范围内。
- 3) 样品未保存在 -80°C ：材料用完立即液氮速冻，保存于 -80°C 。
- 4) 材料取出后未立即处理或冷冻：材料取出后应立即处理。
- 5) 电泳缓冲液 pH 过高：确保待测样品电泳时使用新鲜缓冲液。
- 6) 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。

2、RNA 提取量少。

- 1) 研磨不充分：研磨时要充分研磨。
- 2) 样品过少，浓度过低：加大样品用量。

3、DNA 污染。

- 1) 样品中含有强碱性物质：适当加入 3mol/L 醋酸钠 (pH5.2, RNase-free)。
- 2) 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。

4、蛋白、多糖污染。

- 1) 材料中蛋白、多糖含量高：用氯仿多抽提一次。
- 2) 吸液时将中间固相吸入：吸液时小心，勿将中间相吸入，若吸入，可用氯仿再抽提一次。