

操作手册

TRIcom Reagent (总 RNA 提取试剂)

Catalog No. TR201-50(50ml) TR201-100(100ml)

Highlights

- 适用于从来源于人，动植物，酵母，细菌和病毒的液体样品和细胞或组织中提取总 RNA 的试剂。
- 此产品仅供科研使用。

Ver.1.0.1

保存条件:

2-8℃ 避光保存9-12个月

警告: 本试剂有腐蚀性, 请勿直接接触皮肤或吞咽; 操作时请穿戴实验服、防护镜和手套; 如果接触皮肤, 应立即用洗涤剂和大量水冲洗; 易燃。

产品简介:

本产品 **TRIcom reagent** 是可即用的从细胞和组织中提取总 RNA 的试剂, 在样品裂解或匀浆过程中, 可保持 RNA 完整性, 同时裂解细胞, 溶解细胞内含物。加入氯仿后, 溶液分为水相和有机相, RNA 在水相中。取出水相, 用异丙醇可沉淀回收 RNA; 中间层用乙醇沉淀可回收 DNA; 有机相用异丙醇沉淀可回收蛋白。

注意事项:

匀浆后, 加氯仿前, 样品可在-70℃ 放置一个月以上;

RNA 沉淀可以保存在75%酒精中, 2-8℃一个星期以上或-20℃一年以上。

预防RNase 污染, 应注意以下几方面:

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌, 可能导致RNase 污染。
2. 使用无RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA 在本试剂中时不会被RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4小时, 塑料器皿可在0.5 M NaOH 中浸泡10分钟, 然后用水彻底清洗, 再灭菌, 即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用RNase-free ddH₂O。(将水加入到干净的玻璃瓶中, 加入DEPC至终浓度0.1%(v/v), 放置过夜, 高压灭菌)。

RNA 提取操作步骤:

准备试剂: 氯仿、异丙醇、RNase-free ddH₂O、75%乙醇(用RNase-free ddH₂O配制)。

1. 匀浆处理

a. **植物组织:** 以叶片RNA 提取为例。取新鲜叶片在液氮中充分研磨或将叶片剪碎后直接在**TRIcom**中研磨, 研磨要迅速, 最好不要超过1分钟。大约100 mg 叶片使用1 ml **TRIcom**。

b. **动物组织:** 以鼠肝脏RNA 提取为例。取新鲜或-70℃冻存组织, 每30-50mg 组织加入1 ml **TRIcom**, 用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积一般不要超过**TRIcom**体积的10%。

c. **单层培养细胞:** 单层贴壁细胞的收集(收集细胞数量请不要超过 1×10^7): 可直接在培养容器中裂解(容器体积不超过10cm), 或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀。(在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处

理的方法)。

1) 直接裂解法: 直接在培养板中加入 **TRIcom** 裂解细胞, 每 10 cm^2 面积加入 1 ml TRIcom 。用取样器吹打几次。

注意: TRIcom 加量根据培养板面积决定, 不是由细胞数决定。如果 TRIcom 加量不足, 可能导致提取的 RNA 中有 DNA 污染。

2) 胰蛋白酶处理法: 确定细胞数量, 吸除培养基, 用 PBS 洗涤细胞, 吸除 PBS, 向细胞中加入含有 $0.1\text{-}0.25\%$ 胰蛋白酶的 PBS 处理细胞, 当细胞脱离容器壁时, 加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶, 将细胞溶液转移至 RNase-free 的离心管中, $300\times g$ 离心 5 分钟, 收集细胞沉淀, 仔细吸除所有上清。

注意: 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。

d. 细胞悬液: 离心取细胞。每 $5\times 10^6\text{--}10^7$ 动物、植物和酵母细胞或每 10^7 细菌细胞加入 1 ml TRIcom 。加入 **TRIcom** 前不要洗涤细胞, 以免降解 mRNA。一些酵母和细菌细胞可能需要匀浆仪处理。

e. 血液处理: 直接取新鲜的血液, 加入 3 倍体积 **TRIcom** (推荐 0.25 ml 全血加入 0.75 ml TRIcom), 充分振荡混匀。

2. 将匀浆样品在 $15\text{--}30^\circ\text{C}$ 放置 5 分钟, 使得核酸蛋白复合物完全分离。

3. 可选步骤: 4°C $12,000\text{ rpm}$ ($\sim 13,400\times g$) 离心 10 分钟, 取上清。

注意: 如果样品中含有较多蛋白、脂肪、多糖或肌肉、植物结节部分等, 可离心去除。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。处理脂肪组织样品时, 上层是大量油脂, 应除去。取澄清的匀浆溶液进行下一步操作。

4. 每使用 1 ml TRIcom 加入 0.2 ml 氯仿, 盖好管盖, 剧烈振荡 15 秒, 室温放置 3 分钟。

注意: 如不能旋涡混匀, 可手动颠倒混匀 2 分钟代替。

5. 4°C $12,000\text{ rpm}$ ($\sim 13,400\times g$) 离心 10-15 分钟, 样品会分成三层: 有机相, 中间层和上层无色的水相, RNA 主要在水相中, 把水相 (约 $500\text{ }\mu\text{l}$) 转移到新的离心管中。(如要分离 DNA 和蛋白质, 可参见 Invitrogen 的 trizol 说明书的提取方法)。

6. 在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇, 混匀, 室温放置 20-30 分钟。

7. 4°C $12,000\text{ rpm}$ ($\sim 13,400\times g$) 离心 10 分钟, 去上清。离心前 RNA 沉淀经常是看不见的, 离心后在管侧和管底形成胶状沉淀。

8. 加入 1 ml 75% 乙醇 (**DEPC** 处理过的水配制) 洗涤沉淀。每使用 1 ml TRIcom 至少用 1 ml 75% 乙醇对沉淀进行洗涤。

9. 4°C $5,000\text{ rpm}$ ($\sim 2,300\times g$) 离心 3 分钟。倒出液体, 注意不要倒出沉淀, 剩余的少量液体短暂离心, 然后用枪头吸出, **注意不要吸起沉淀。**

10. 室温放置晾干（不要晾的过干，RNA 完全干燥后会很难溶解，大约晾干2—3分钟左右即可），根据实验需要，加入30-100 μ l RNase-free ddH₂O，反复吹打、混匀，充分溶解RNA。

不同组织或细胞RNA 提取预期得率

植物叶片	100–200ug/g 叶片
动物组织	6-10ug/mg 肝脏组织
动植物培养细胞	5–10ug/mg 细胞
大肠杆菌	2–10ug/mg DH5 α 过夜菌
血液	15-20ug/mL 人全血

问题指南

问题	解决方案
低得率	<ol style="list-style-type: none"> 1. 样品裂解或匀浆处理不彻底。 2. 最后得到的 RNA 沉淀未完全溶解。
A260/ A280<1.65	<ol style="list-style-type: none"> 1. 检测吸光度时，RNA 样品不是溶于 TE，而是溶于水。 2. 低离子浓度和低 pH 条件下，A280 值会较高。 3. 样品匀浆时加的试剂量太少。 4. 匀浆后样品未在室温放置 5 分钟。 5. 水相中混有有机相。 6. 最后得到的 RNA 沉淀未完全溶解。
RNA 降解	<ol style="list-style-type: none"> 1. 组织取出后没有马上处理或冷冻。 2. 样品或提取的 RNA 沉淀保存于-5– -20$^{\circ}$C，未在-60– -70$^{\circ}$C 保存。 3. 细胞在胰蛋白酶处理时被破坏。 4. 溶液或离心管未经 RNase 去除处理。
DNA 污染	<ol style="list-style-type: none"> 1. 样品匀浆时加的试剂体积太少。 2. 样品中含有组织溶剂（如乙醇，DMSO 等），强缓冲液或碱性溶液。
蛋白和多糖污染	<ol style="list-style-type: none"> 1. 样品中蛋白、多糖含量高。 2. 样品量太大。 3. 水相中混有有机相。