

# 总RNA提取试剂 (TRIcom Reagent)

(使用说明书 Ver.1.0.4)

## 产品特点

- ✧ 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。

产品货号：

TR201-10 (10次反应) TR201-50 (50次反应) TR201-100 (100次反应)

TR201-10-G (10次反应) TR201-50-G (50次反应) TR201-100-G (100次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

# 目录Contents

产品介绍	1
保存条件	1
注意事项	1
操作步骤	1
◇ 不同组织或细胞RNA 提取预期得率	3
FAQ常见问题及解决方法	3

## 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。

## 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。

## 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. 配制溶液应使用无DNase/RNase水。（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）。

## 操作步骤:

准备试剂：氯仿、异丙醇、无DNase/RNase水、75%乙醇（用无DNase/RNase水配制）。

### 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 $1 \times 10^7$ ）：可直接在培养容器中裂解（容器体积不超过10cm<sup>3</sup>），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<sup>2</sup> 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0.1-0.25%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，将细胞溶液转移至无DNase/RNase的离心管中，300×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5×10<sup>6</sup>—10<sup>7</sup> 动物、植物和酵母细胞或每10<sup>7</sup>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0.25ml全血加入0.75ml TRIcom），充分振荡混匀。

2. 将匀浆样品在15—30℃放置5分钟，使得核酸蛋白复合物完全分离。

3. 可选步骤：4℃ 12,000 rpm(~13,400×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℃ 12,000 rpm(~13,400×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 μl）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℃ 12,000 rpm(~13,400×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℃ 5,000 rpm(~2,300×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 μl 无DNase/RNase水，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 DH5α 过夜菌
血液	15–20ug/mL人全血

## FAQ常见问题及解决方法

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