

总RNA 提取试剂盒（配合TRIZOL磁珠法）

使用说明书 (Ver.1.2.1)

产品特点

- ◇ 适用于从细胞，组织，酵母菌，植物，细菌或生物液体（任何 TRIZOL 或类似产品可以裂解的样品）及保存在样本保存液中的样品提取到总 RNA（含 microRNA）。
- ◇ 无需进行相分离，无需使用氯仿，无需沉淀过程。
- ◇ 提取到的 RNA 不含 DNA,并可应用于 q-PCR，高通量测序等实验。

产品货号：

TB210-32（32次反应） TB210-96（96次反应）



扫描二维码了解更多产品信息

目录Contents

产品组份	1
产品特性	1
溶液制备	1
操作步骤	1
◇ 样品前处理	1
◇ RNA纯化	4
组件查询	4

产品组份

试剂盒组成	32 次	96 次	保存
TRIcom(选配)	50 ml	150 ml	4°C
磁珠 DNA/RNA 洗涤液 1	15 ml	45 ml	室温
磁珠 DNA/RNA 洗涤液 2	10 ml	30 ml	室温
无 DNase/RNase 水	15 ml	30 ml	室温
磁珠	1.5 ml	5 ml	室温

产品特性

- ✧ 样品来源：TRIZOL 等类似试剂裂解的样品及保存在 DNA/RNA 保护剂中的样品。
- ✧ 提取到高质量 RNA 可应用于 NGS，RT-PCR 等实验。

溶液制备（使用之前需要配制）

- ✧ 添加 10 ml 或 30ml 的异丙醇到 15 ml 或 45ml 的磁珠 DNA/RNA 洗涤液 1 中。
- ✧ 添加 15 ml 或 45ml 的异丙醇到 10 ml 或 30ml 的磁珠 DNA/RNA 洗涤液 2 中。
- ✧ 加入后请及时在方框内打钩标记，以免多次加入。
- ✧ 自备氯仿、异丙醇。

操作步骤：

RNA的分离包括两个步骤：(I)样品前处理（样品裂解/均质化）；(II) RNA纯化

注意：确保RNA提取过程是在一个无DNase/RNase的环境中，

(I) 样品前处理

1、样品裂解/匀浆

此步骤主要参考 TRIZOL 等类似裂解试剂说明书的裂解液用量，以下给出我公司提供的可完美替换 TRIZOL 的 TRIcom 试剂用量作为参考。

a. 组织

动物组织：每30~50mg组织加1ml的TRIcom。裂解之后需要离心去除不溶的组织，然后将上清移置到一个无DNase/RNase的离心管内进行下面的样品纯化步骤。

植物组织：每50~100mg组织加1ml的TRIcom。裂解之后需要离心去除不溶的组织，然后将上清移置到一个无DNase/RNase的离心管内进行下面的样品纯化步骤。

b. 单层生长的细胞

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^2 ），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 10cm^2 面积加入 1ml TRIcom。用取样器吹打几次。

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，将细胞溶液转移至无DNase/RNase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。去除液体培养基后，直接往培养板中加入TRIcom溶解细胞，并用移液枪轻轻吹打混匀。依据细胞的数量来决定所需的TRIcom量（ 10^5 细胞以内加 $100\mu\text{l}$ ， 10^6 细胞加 $300\mu\text{l}$ ）。

c. 悬浮生长的细胞

离心沉淀细胞($\leq 500 \times g$)，完全去除上清后用TRIcom重悬细胞沉淀。可短暂涡旋振荡。

d. 细胞悬液

离心取细胞。每 $5 \times 10^6 - 10^7$ 动物、植物和酵母细胞或每 10^7 细菌细胞加入 1ml 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. 添加保护剂的样品

离心沉淀细胞，取上清 200ul ，添加 200ul 等体积的TRIcom。

以上样本处理操作完成后，请适当消化（低温保存或低温过夜消化）或研磨仪破碎处理，可选用简石™适配的各类型研磨珠配套简石™研磨仪破碎处理。破碎条件如下：

样品种类		样品量	需添加量 TRIcom	(I)样品前处理（样品裂解/匀浆）
细胞	悬浮动物细胞培养	$\leq 10^5$	$\geq 100\mu\text{l}$	离心沉淀细胞 / 直接在培养皿中裂解 方案1：离心细胞悬液，以 $\leq 500 \times g$ 的离心速度离心1分钟，去除上清后用适量TRIcom反复吹打来重悬裂解细胞。 方案2：单层贴壁细胞，可在培养皿中直接裂解。每 1cm^2 培养表面积加入 $100\mu\text{l}$ TRIcom。（容器体积 $\leq 10\text{cm}^2$ ）室温放置3min 注意：贴壁培养细胞通常不能完全从培养瓶（皿）脱落，这并不意味着裂解不完全，此时细胞膜已完全破裂开，核酸已释放。
		$\leq 10^6$	$\geq 300\mu\text{l}$	
	贴壁动物细胞培养	$\leq 5 \times 10^6$	$\geq 600\mu\text{l}$	
		革兰氏(-)菌	$\leq 10^8$	

组织 动植物, 新鲜/冷冻样品	哺乳动物	30-50 mg	1ml	液氮研磨 / 样品破碎仪 (垂直振荡低温款) 方案1: 将组织在液氮里迅速研磨成粉末, 再添加 1ml TRIcom, 室温放置3-5min 方案2: 添加1ml TRIcom, 配合样品破碎仪 (垂直 振荡低温款)+裂解珠(2.0 mm), 机器处理 程序如下 动物组织: (60Hz, 45s/周期×1) 植物/昆虫: (60Hz, 45-60s/周期×2)
	植物/种子/ 昆虫	50- 100mg	1ml	
微生物	细菌/酵母/ 粪便/土壤			样品均质仪 (“8”字旋转低温款) +裂解珠(0.5 mm&0.1 mm) 机器处理程序: (6m/s, 30s/周期×2)
液体样品	血浆/血清/ 白细胞/脑 脊液等	100µl	300µl	液体样品中加入3倍体积的LS-TRIcom, 混合均匀 室温放置3min
难裂解的样品	组织/酵母/ 植物等			可以使用液氮研磨 / 研磨仪 (垂直或 “8”字低温 款) 配合蛋白酶K和裂解珠(不同样品选配)
DNA/RNA 保护剂 (EZShied®)	保存在其中 中的组织/ 细胞	100µl	100µl	添加了DNA/RNA保护剂 (EZShied®) 的匀浆样 品放到室温下 (无需去除保护剂), 添加1倍体 积的LS-TRIcom、混匀室温放置3min
RNAlater™	保存在其中 的组织/ 细胞			首先去除RNAlater™, 只保留样品。 然后参考上述对应的样品前处理方案。

2、匀浆后的样品是否采用氯仿处理可分为不同的操作步骤!

常规Trizol上清处理	氯仿有机相抽提 (可选步骤)
<p>a. 上述处理后的匀浆样本, $\geq 16000g$, 高速离心 10min。</p> <p>b. 可取得上清的范围约100µl~ 600µl (不同样本处理, 加入TRIcom 体积不同, 所得上清不同) 加到一个干净的无 DNase \ RNase的离心管中, 下接 RNA纯化步骤 1</p>	<p>a. 上述处理后的匀浆样本, 按照体积的20%添加氯仿 (例如: 1ml Trizol 与200µl氯仿充分混匀), 剧烈振荡混匀液相, 5min, 成乳化液相。</p> <p>b. 上述乳化液相, $\geq 16000g$高速离心10min。</p> <p>c. 上述离心后所得干净的水相范围约 100µl~ 600µl 加到一个干净的无DNase \ RNase 的离心管中 (不同样本处理, 加入TRIcom 体积不同, 所得上清不同), 下接 RNA纯化步骤 1</p>

(II) RNA纯化

1. 加入等体积(95-100%)的无水乙醇到上一步TRIcom或TRIZOL裂解液中混匀（如果有未裂解完全的沉淀需要离心取上清部分操作）。
2. 取振荡混匀的磁珠 20 μ l 添加到上述混合物中，用枪头混匀或者放在振荡器上振荡10-15 分钟。
3. 将管子转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将管子从磁力架上移走。
4. 添加 500 μ l 磁珠 DNA/RNA 洗涤液 1 到样品中混匀。
5. 将管子转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将管子从磁力架上移走。
6. 添加700 μ l 磁珠 DNA/RNA 洗涤液 2 到样品中混匀。
7. 将管子转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将管子从磁力架上移走。
8. 添加 500 μ l 乙醇（95%-100%）到样品中混匀。
9. 将管子转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将管子从磁力架上移走。
10. 重复步骤 8，9。
11. 将管子移到一个加热模块上（55 $^{\circ}$ C）直到磁珠变干（大概 10 分钟），如果没有加热模块，可以在室温下放20-30 分钟自然晾干。（避免过度干燥影响磁珠的洗脱效率）
12. 添加 50 μ l 的无DNase/RNase水到管中重悬磁珠，混匀磁珠 10 分钟，然后将管子移到一个磁力架上，放置2-3 分钟直到磁珠完全沉淀下来。将上清（RNA）转移到一个干净的管子内。

组件查询

组件名称	货号	规格	储存
TRIcom(选配)	TR201-50	50ml	4 $^{\circ}$ C
磁珠 DNA/RNA 洗涤液 1	TR2130-1-15	15ml	室温
	TR2130-1-45	45ml	室温
磁珠 DNA/RNA 洗涤液 2	TR2130-2-10	10ml	室温
	TR2130-2-30	30ml	室温
无 DNase/RNase 水	TW1001-15	15ml	室温
	TW1001-30	30ml	室温
磁珠	TD4100-2-1.5	1.5ml	室温
	TD4100-2-5	5ml	室温