

少量总RNA提取试剂盒 (从TRIZOL[®]裂解物中提取)

使用说明书 (版本号: Ver.1.1.3)

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)中提取到总RNA(含microRNA)。
- ◇ 无需进行相分离、无需使用氯仿、无需沉淀过程。
- ◇ 整个过程仅需10分钟。提取到的RNA不含DNA，并可应用于Q-PCR, NGS等实验

产品货号:

TR205-10 (10次反应无DNase I) TR205-50 (50次反应无DNase I)

TR205-200 (200次反应无DNase I)

TR205-D-10 (10次反应含DNase I) TR205-D-50 (50次反应含DNase I)

TR205-D-200 (200次反应含DNase I)



更多产品信息

目录Contents

产品组份	1
注意事项	1
产品特性	2
产品描述	2
溶液制备	3
操作步骤	3
◇ 样品前处理	3
◇ RNA纯化	4
FAQ常见问题及解决方法	5
平均RNA产量是多少?	6
其他产品订购信息	7
组件查询	8

产品组份

试剂盒组成	TR205-10	TR205-50	TR205-200	TR205-D-10	TR205-D-50	TR205--D-200	保存
TRIcom Reagent	-	-	-	-	-	-	4°C
RNA洗涤液1 (未添加乙醇)	8ml	40ml	160ml	8ml	40ml	160ml	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇						
RNA洗涤液2 (未添加乙醇)	3ml	12ml	48ml	3ml	12ml	48ml	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇						
无DNase/RNase水	2ml	6ml	30ml	2ml	6ml	30ml	室温
DNase I		-	-	250U	1500Ux1管	1500Ux4管	-20°C
DNA消化液		-	-	1ml	4ml	16ml	室温
2号 CR 纯化柱	10个	50个	50个*4	10个	50个	50个*4	室温
2ml收集管	10个	50个*2	200个*2	10个	50个*2	200个*2	室温

注意事项

- ✧ 简石生物产品仅供研究使用，并应由供专业人员操作。本试剂盒中包含的一些试剂是刺激物。请戴好防护手套和护眼用品。遵循您的研究机构或设施制定的安全准则和规则。售出后一年内产品可质保。试剂盒已经过大量的常规检测来保证其可操作性。
- ✧ RNA提取，防RNase污染
 1. 更换新手套，皮肤表层附着微生物，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TRI Reagent®类中时不会被RNase降解。但提取过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。
玻璃器皿可在150°C烘烤4 h；
塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min, 用水彻底清洗。灭菌后，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), 混匀后放置过夜，高压灭菌)

产品特性

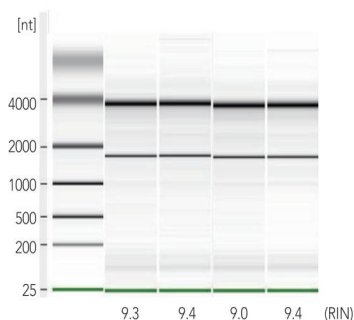
- ◇ 样品来源 - 任何存储在TRIZol®、或TRI Reagent®类中的样品。（动物细胞、组织、细菌、酵母、生物体液、存储在DNA/RNA保护剂（EZShied®）和体外处理的RNA（例如转录产物、经过DNase处理或标记的RNA）
- ◇ 样品灭活 - TRI Reagent®类抑制RNase活性并灭活病毒和其他传染物。
- ◇ RNA大小 - 包括small/microRNA (≥ 17 nt) 的总RNA。
- ◇ 核酸纯度 - A260/A280 & A260/A230 > 1.8 。RNA适用于NGS、RT-qPCR等。
- ◇ 结合能力 - 50 μg 总RNA（2号CR纯化柱）。
- ◇ 兼容性 - 可以使用基于胍盐的试剂（如TRIZol®、RNAzol®、QIAzol®、TriPure™、TriSure™）替代TRI Reagent®。同时，兼容存储在TRIZol®、TRI Reagent®或类似试剂中的样品，这些试剂中包含氯仿、1-溴-3-氯丙烷（BCP）或4-溴苯甲醚（BAN），相分离样品的水相和存储在RNAlater™中的样品。关于与十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）基提取的兼容性，请参阅详细的操作步骤。
- ◇ 洗脱体积 - ≥ 25 μl 无DNase/RNase水。
- ◇ 需要的设备（用户提供） - 微量离心机。

产品描述

少量总RNA提取试剂盒（从TRIZol®裂解物中提取）提供了一种简化的方法，可以直接从TRIZol®、TRI Reagent®或类似的样品中纯化高质量的RNA，每次制备可达50 μg 。该方法可以有效地从各种样品来源（细胞、组织、血清、血浆、血液、存储在DNA/RNA保护剂中的样品等）中分离包括small/micro RNA（17-200 nt）在内的总RNA。

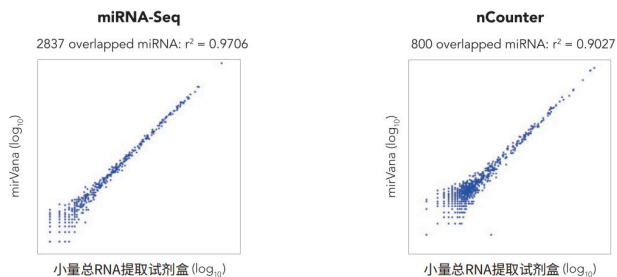
只需将乙醇加入TRI Reagent®样品中，直接与2号CR纯化柱结合，洗涤并洗脱RNA。不需要相分离、沉淀或纯化后的步骤。得到的RNA可以直接用于下一代测序、RT-qPCR、转录分析、杂交等应用。

1. 从人上皮细胞中纯化出高质量的RNA



RNA完整性数（RIN > 9 ; Bioanalyzer（Agilent Technologies Inc.））表明使用简石生物总RNA提取试剂盒从人上皮细胞中纯化出高质量的RNA。

2、可采用自动化提取步骤实现低丰度样本的高通量提取



使用小量总RNA提取试剂盒（与mirVana™，Ambion相比）从TRIzol样品中回收总RNA。使用miRNA-Seq（MiSeq®, Illumina）和直接杂交分析（nCounter, Nanostring）进行microRNA分析。

溶液制备

- ◇ RNA洗涤液在使用之前一定要配好，添加好乙醇后在试剂瓶上做好标记！
- ◇ 添加10ml或40ml的无水乙醇(95-100%)到40ml或160ml的RNA洗涤液1中；
- ◇ 添加48ml 100%的乙醇(或52ml 95%的乙醇)到12ml的RNA洗涤液2中；
- ◇ 添加192ml 100%的乙醇(或208ml 95%的乙醇)到48ml的RNA洗涤液2中；
- ◇ 试用装需要按照瓶子上标注的量来添加。
- ◇ 冻干粉状态的DNase I在使用之前添加试剂盒自带的无DNase/RNase水配成溶液，混匀后分装成小份冷冻保存：
TE1011-A（1500U）加入275μl水。
TE1009-A（250U）加入55μl水。

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，
以下离心力如无特殊说明均在10,000-16,000xg范围内离心1分钟。

(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(固体样品处理) / LS-TRIcom（液体样品处理）试剂用量作为参考。

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 $\leq 500 \times \text{g}$ 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 $\times 1$) 植物/昆虫: (60Hz, 45-60s/周期 $\times 2$)
	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 $\times 2$)
液体样品	血浆/血清/白细胞/脑脊液等	100 μl	300 μl	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®)	保存在其中的组织/细胞	100 μl	100 μl	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，$\geq 16000\text{g}$，高速离心10min。</p> <p>b. 上述所得可用干净的上清范围约$100\mu\text{l}\sim 600\mu\text{l}$（不同样本处理，加入TRIzol 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$200\mu\text{l}$氯仿充分混匀），剧烈振荡混匀液相，5min，成乳化样。</p> <p>b. 上述乳化液相，$\geq 16000\text{g}$高速离心10min。</p> <p>c. 上述离心后所得干净的水相范围约 $100\mu\text{l}\sim 600\mu\text{l}$ 加到一个干净的无 DNase \ RNase 的离心管中（不同样本处理，加入TRIzol 体积不同，所得上清不同），下接 RNA 纯化步骤 1</p>

(II) RNA纯化:

以下离心力如无特殊说明均在 $10,000\sim 16,000\text{g}$ 范围内离心1分钟

1. 加入等体积(95-100%)的无水乙醇到上一步TRIzol或TRIzol®裂解液中混匀。
2. 将上述混合物放入套在收集管上的2号CR纯化柱里，离心1分钟。去除滤出液。
3. 柱上DNase I消化处理 (推荐)此步骤主要是为了去除痕量的DNA。
 - a) 添加 $400\mu\text{l}$ 的RNA洗涤液2到2号C纯化柱里离心1分钟,去除滤出液。
 - b) 对于每一次的样品处理需要制备 $80\mu\text{l}$ 的DNase I反应液。配比为DNase I $5\mu\text{l}$ 、DNA消化液 $75\mu\text{l}$ 。
 - c) 直接添加 $80\mu\text{l}$ 的DNase I反应液到2号CR纯化柱上，在室温下($20\sim 30^\circ\text{C}$)孵育15分钟。
4. 添加 $400\mu\text{l}$ 的RNA洗涤液1到2号CR纯化柱里，离心1分钟。去除滤出液。
5. 添加 $700\mu\text{l}$ 的RNA洗涤液2到2号CR纯化柱里，离心1分钟。去除滤出液。
6. 空转2分钟以去除残留的乙醇，以免抑制下游反应。
7. 取出2号CR纯化柱，放入一个无RNA酶的离心管中，在吸附膜的中间部位加 $50\mu\text{l}$ 无DNase/RNase水

(事先在 $65\sim 70^\circ\text{C}$ 水浴中加热效果更好)，室温放置2分钟，离心1分钟洗脱RNA。得到的超纯 RNA 可进行后续实验了！

FAQ常见问题及解决方法

Q: 问题	A: 可能的原因和推荐的解决方案
是否需要DNase I处理；溶解后的DNase I如何保存	<ol style="list-style-type: none"> 1. 简石生物提供的 DNase I套件（DNase 和 DNA 消化缓冲液）的目录号是 TE1010； 如果下游应用需要无DNA的RNA，我们建议柱上做DNase I处理，后续洗涤可去除片段化的DNA，避免浓度高。 2. 冻干DNase I在室温下比较稳定。液体悬浮后，可选择冷冻储存(-20°C)等分试样。尽可能减少冻融循环。冻融会降低酶活性。

<p>少量总RNA提取试剂盒（从TRIZOL®裂解物中提取）和少量总RNA提取试剂盒有什么区别？</p>	<p>总RNA快速提取试剂盒（从TRIZOL®裂解物中提取）直接用于储存/收集到TRIZOL®/TRIcom类似试剂中的样品。少量总RNA提取试剂盒适用于所有其他样品，</p>
<p>样品可以在处理前，可以储存在RNA裂解液里吗？</p>	<p>可以，RNA裂解液中的样品在室温下过夜是稳定的，并且可以冷冻储存（-80°C）。但是请确保在冷冻之前充分裂解和均质化样品。如需进行RNA纯化之前，请将样品恢复至室温。</p>
<p>RNA洗涤液用完了，可以使用其他溶液替代吗？</p>	<p>使用80%乙醇作为替代品。RNA洗涤缓冲液也单独出售。</p>
<p>如何提高纯度，RIN值并消除污染？（及A₂₆₀/A₂₃₀, A₂₆₀/A₂₈₀比率，DNA, 苯酚，蛋白质，盐等）</p>	<p>纯度、RIN和/或任何类型的污染都可能由初始样品制备（即样品裂解效率低下）引起。需要优化/增加裂解试剂的体积（例如，TRI试剂/TRIZOL®/TRIcom或RNA裂解液）。</p>
<p>如何提高RNA产量？</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 确保完全裂解，增加裂解试剂的体积（即增加 TRI 试剂 /TRIZOL®/TRIcom 或 RNA 裂解缓冲液的体积）。 2. 裂解物应透明（不透明或粘稠）。通过离心（如果需要）沉淀碎片并处理澄清的上清液 3. 在添加TRI试剂/TRIZOL®/TRIcom或RNA裂解液之前，在DNA/RNA保护剂（EZShield®）（TR110）中进行酶处理（蛋白酶K）/或机械匀浆（使用对应不同样品的珠裂解管+破碎仪处理）

平均RNA的产量是多少？

样品	平均核糖核酸产量	试剂盒最大上样量
细胞	10 µg (每10 ⁶ 个细胞)	最高可达5 × 10 ⁶
Hela	15µg	
高产组织 ¹ (小鼠)	≥ 30 µg (每10mg)	最高可达10mg
脾脏	30-50 µg	
肝脏	40-60 µg	
低产组织 ¹ (小鼠)	≤ 30 µg (每10mg)	最高可达25mg
肌肉	5-20 µg	
肺	10-20 µg	
大脑、心脏	5-15 µg	
肠道	10-30 µg	
肾脏	20-30 µg	

全血 ²	(每1ml)	最高可达1ml
猪	10-20 µg	
人类	2-10 µg	

1. 组织的产量可能会因其他因素而有所变化（例如，生物类型、生理状态和生长条件）
2. 血液的产量可能会因采集、样品制备、供体、年龄和/或健康状况而有所变化。

其他产品订购信息

DNA/RNA保护剂 (EZShied®)		
TR110	DNA/RNA保护剂 (EZShied®) -固体样品保护剂	瓶
TR120	DNA/RNA保护剂 (EZShied®) -液体样品保护剂	瓶
TS001-TS010	各类样品的采样套装 (含RNA保护剂)	套
难以裂解样品- 辅助耗材和设备		
TS6003	植物/动物组织-裂解管 (2.0 mm)	50支/包
TS6012	微生物--裂解管 (0.1 + 0.5 mm)	50支/包
TS6014	组织/昆虫中的微生物--裂解管 (0.1 + 2.0 mm)	50支/包
TI2019	样品研磨仪 (垂直振荡) -适合植物/组织DNA提取	1台
T9548R	冷冻研磨仪 (垂直振荡) -适合植物/组织RNA提取	1台
TI2023-24	样品均质仪 (“8”字旋转常温款) -适合微生物DNA	1台
TI2023-24R	冷冻样品均质仪 (“8”字旋转低温款) -微生物RNA	1台
RNA提取纯化系列		
总RNA快速提取试剂盒 (从TRIzol®裂解物中提取)		
TR199	LS液体样本总RNA提取试剂 (TRIcom Reagent)	50/100ml
TR201	总RNA提取试剂 (TRIcom Reagent)	50/100ml
TR205	少量总RNA提取试剂盒-50	50/200次
TR206	微量总RNA提取试剂盒-50	50/200次
TB210	总RNA提取试剂盒 (配合TRIzol®磁珠法)	32/96次
少量总RNA提取试剂盒 (任何样品的RNA提取纯化)		
TR150	快速RNA微量提取试剂盒-10	50/200次

TR154	快速RNA小量提取试剂盒-100	50/200次
TR134	病毒RNA提取试剂盒	50/200次
TR202	环境样品通用DNA/RNA提取试剂盒	50次
TR121	全血RNA提取试剂盒（DNA/RNA保护剂（EZShied®））	50次
TR108	FFPE样品RNA提取试剂盒	50次
TR159	血清血浆cfRNA提取试剂盒（离心柱）	50次
TR225	多糖多酚植物RNA提取试剂盒（离心柱）	50次
TB226	多糖多酚植物RNA提取试剂盒(磁珠法)	48次
RNA-Seq (RNA建库产品)		
R3000	Zymo-Seq RiboFree Total RNA Library Kit	12/96次

组件查询

组件名称	货号	规格	储存
TRIcom Reagent- LS (液体样本) (选配)	TR199-50	50ml	4°C
	TR199-100	100ml	
TRIcom Reagent (固体样本) (选配)	TR201-50	50ml	4°C
	TR201-100	100ml	
RNA洗涤液1 (未添加乙醇)	TR2050-2-8	8ml	室温
	TR2050-2-40	40ml	
	TR2050-2-160	160ml	
RNA洗涤液2 (未添加乙醇)	TR1003-3-3	3ml	室温
	TR1003-3-12	12ml	
	TR1003-3-48	48ml	
无DNase/RNase水	TW1001-2	2 ml	室温
	TW1001-6	6 ml	
	TW1001-30	30 ml	
DNase I	TE1009-A	250U	-20°C
	TE1011-A	1500U	
DNA消化液	TE1010-1-1	1ml	室温
	TE1010-1-4	4ml	
	TE1010-1-16	16ml	

2号CR纯化柱	TC1078-10	10个/包	室温
	TC1078-50	50个/包	
3号F纯化柱 (红) (选配)	TC1057-10	10个/包	室温
	TC1057-50	50个/包	
2ml收集管	TC1001-10	10个/包	室温
	TC1001-50	50个/包	
	TC1001-200	200个/包	