

# 总 RNA 快速提取试剂（同 TRIzol）

货号：HKR022

## 【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
总 RNA 快速提取试剂（同 TRIzol）	HKR022	50mL/100mL	一年

## 【产品简介】

总RNA快速提取试剂（同TRIzol）适用于从细胞和组织中快速分离RNA。本产品有多组分分离作用，使样品匀浆化，细胞裂解，溶解细胞内含物，同时保持RNA的完整性。在加入氯仿离心后，溶液分为水相和有机相，RNA在水相中。取出水相用异丙醇沉淀可回收RNA；用乙醇沉淀中间层可回收DNA；用异丙醇沉淀有机相可回收蛋白质。

总RNA快速提取试剂（同TRIzol）可用于小量样品（50~100mg组织、 $5 \times 10^6$ 细胞）也适用于大量样品（ $\geq 1g$ 组织、 $> 10^7$ 细胞）。对人，动物，植物组织，细菌均适用，整个提取过程在一小时内即可完成。分离的总RNA无蛋白质和DNA污染，可用于Northern blot, dot blot, ployA 筛选，体外翻译，RNase 保护分析和分子克隆。在用于RT-PCR时如果两条引物存在于一个单一外显子内，建议用无RNase的DNase I 处理RNA样品，避免出现假阳性。共纯化的DNA可用作标准，比较不同样品RNA的得率，也可用于PCR和酶切。蛋白质可用于western blotting。

## 【储存与运输】

冰袋运输。4℃避光保存，有效期一年。

## 【使用方法】

### RNA 的提取

准备试剂：氯仿，异丙醇，75%乙醇，无 RNase 的水或 0.5%SDS(溶液均需用 DEPC 处理过的水配制)

操作步骤:

#### 1. 匀浆处理:

a. 组织将组织在液氮中磨碎,每 50-100mg 组织加入 1ml 总 RNA 提取试剂,用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积不应超过总 RNA 提取试剂体积 10%。

b. 单层培养细胞直接在培养板中加入本产品裂解细胞,每 10cm<sup>2</sup> 面积加 1ml,用移液器吸打几次。总 RNA 提取试剂的用量应根据培养板面积而定,不取决于细胞数。总 RNA 提取试剂加量不足可能导致提取的 RNA 有 DNA 污染。

c. 细胞悬液离心收集细胞，每  $5-10 \times 10^6$  动物、植物、酵母细胞或  $1 \times 10^7$  细菌细胞加入 1ml 总 RNA 提取试剂，反复吸打。加总 RNA 提取试剂之前不要洗涤细胞以免 mRNA 降解。一些酵母和细菌细胞需用匀浆仪处理。

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

3. 可选步骤：如样品中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或胞外物质（肌肉，植物结节部分等）可于  $2-8^\circ\text{C}$   $10000 \times g$  离心 10 分钟，取上清。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。处理脂肪组织时，上层有大量油脂应去除。取澄清的匀浆液进行下一步操作。

5. 每使用 1ml 总 RNA 提取试剂加入 0.2ml 氯仿，剧烈振荡 15 秒，室温放置 3 分钟。

6.  $2-8^\circ\text{C}$   $10000 \times g$  离心 15 分钟。样品分为三层：底层为黄色有机相，上层为无色水相和一个中间层。RNA 主要在水相中，水相体积约为所用总 RNA 提取试剂试剂的 60%。

7. 把水相转移到新管中（如要分离 DNA 和蛋白质可保留有机相），用异丙醇沉淀水相中的 RNA。每使用 1ml 总 RNA 提取试剂加入 0.5ml 异丙醇，室温放置 10 分钟。

8.  $2-8^\circ\text{C}$   $10000 \times g$  离心 10 分钟，离心前看不出 RNA 沉淀，离心后在管侧和管底出现胶状沉淀。移去上清。

9. 用 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀。每使用 1ml 总 RNA 提取试剂至少加 1ml 75%乙醇。  $2-8^\circ\text{C}$  不超过  $7500 \times g$  离心 5 分钟，弃上清。

10. 室温放置干燥或真空抽干 RNA 沉淀，不要晾得过于干，否则不易溶解，大约晾 5-10 分钟。加入 25-200 $\mu\text{l}$  无 RNase 的水或 0.5% SDS，用枪头吸打几次， $55-60^\circ\text{C}$  放置 10 分钟使 RNA 溶解。如 RNA 用于酶切反应，勿使用 SDS 溶液。RNA 也可用 100%的去离子甲酰胺溶解， $-70^\circ\text{C}$  保存。

实验注意：

1. 从少量样品（1-10mg 组织或  $10^2-10^4$  细胞）中提取 RNA 是可加入少许糖原以促进 RNA 沉淀。例如加 800ml 总 RNA 提取试剂匀浆样品，沉淀 RNA 前加 5-10 $\mu\text{g}$  RNase-free 糖原。糖原会与 RNA 一同沉淀出来，糖原浓度不高于 4mg/ml 是不影响第一链的合成，也不影响 PCR 反应。

2. 匀浆后加氯仿之前样品可在  $-60-70^\circ\text{C}$  保存至少一个月。RNA 沉淀可保存在 75%酒精中  $2-8^\circ\text{C}$  一个星期以上或  $-5-20^\circ\text{C}$  一年以上。

3. 分层和 RNA 沉淀时也可使用低速台式离心机， $2600 \times g$  离心 30-60 分钟。

预期产量：1mg 组织或  $1 \times 10^6$  细胞提取 RNA 分别为：肝和脾 6-10 $\mu\text{g}$ ，肾 3-4 $\mu\text{g}$ ，骨骼肌和脑组织 1-1.5 $\mu\text{g}$ ，胎盘 1-4 $\mu\text{g}$ ，上皮细胞 8-15 $\mu\text{g}$ ，成纤维细胞 5-7 $\mu\text{g}$ 。

常见问题分析：

得率低：

A. 样品裂解或匀浆处理不彻底

B. RNA 沉淀未完全溶解

A260/A280 < 1.65: A. 检测吸光度时，RNA 样品没有溶于水，而溶于了 TE 中。低离子浓度和低 pH 值条件下 A280 值偏高。

B. 样品匀浆时加的试剂量太少。

C. 匀浆样品时未在室温放置 5 分钟。

D. 吸取水相时混了有机相。

E. RNA 沉淀未完全溶解。

#### RNA 降解:

- A. 组织取出后没有马上处理或冷冻
- B. 待提取 RNA 的样品没有保存于-60 至-70℃,而保存在了-5 至-20℃
- C. 细胞在胰酶处理时过度
- D. 溶液或离心管未经 RNase 去除处理
- E. 电泳时使用的甲醛 pH 值低于 3.5

#### DNA 污染:

- A. 样品匀浆时加的试剂量太少
- B. 样品中含有有机溶剂(如乙醇,DMSO 等),强缓冲液或碱性溶液蛋白聚糖和多糖污染:沉 RNA 的过程中作以下改进可去除这些污染,步骤 7 中,每使用 1ml 总 RNA 提取试剂在水相中加 0.25ml 异丙醇和 0.25ml 高盐溶液(0.8M 柠檬酸钠和 1.2MNaCl)混合离心,按之前操作进行。这种方法可使蛋白聚糖和多糖留在溶液中,高效沉淀出纯 RNA。从含有大量多糖的植物中提取 RNA 时应在匀浆后离心,并加上以上操作步骤。

#### DNA 的分离

准备试剂: 乙醇 0.1M 柠檬酸钠(含 10%乙醇)75%乙醇 8mMNaOH

操作步骤:

1. 样品加氯仿分层后,移去上层水相,用乙醇沉淀中间层和有机相中的 DNA。每使用 1ml 总 RNA 提取试剂加 0.3ml 无水乙醇混匀,室温放置 3 分钟,2-8℃不超过 2000×g 离心 5 分钟。
2. 移去上清,(如需要分离蛋白质,可保留,进一步操作见后)用含 10%乙醇的 0.1M 柠檬酸钠洗涤 DNA 沉淀。每用 1ml 总 RNA 提取试剂加入 1ml 柠檬酸钠,室温放置 30 分钟,2-8℃2000×g 离心 5 分钟,弃上清,重复一次。
3. 用 75%乙醇再洗一遍 DNA 沉淀,每使用 1ml 总 RNA 提取试剂加入 1.5-2ml75%乙醇,室温放置 10-20 分钟(不时颠倒混合)2-8℃2000×g 离心 5 分钟,弃上清。
4. 室温放置晾干 DNA 5-15 分钟,用 8mMNaOH 溶解 DNA。从 50-70mg 组织或 10<sup>7</sup> 细胞中分离的 DNA 溶于 300-600μl8mMNaOH, DNA 的浓度通常为 0.2-0.3μg/μl。提取的 DNA 沉淀不易溶于水和 Tris 缓冲液中,建议用弱碱溶解,8mMNaOH 的 pH 值为 9,溶解 DNA 后可用 TE, HEPES 调节 pH。从某些样品(尤其是组织)中提取的 DNA 中可能包含一些胶状不溶物可>12000×g 离心 10 分钟除去。

DNA 的定量:取一份溶于 8mMNaOH 的 DNA 加水测 A260 值。一单位 A260 值相当于 50μg/ml 双链 DNA。根据 DNA 产量可估计细胞数,人,大鼠,小鼠 1×10<sup>6</sup> 二倍体细胞含 DNA 的量分别为 7.1μg,6.5μg,5.8μg。

预期产量: 1mg 组织或 1×10<sup>6</sup> 细胞提取 DNA 分别为肝和肾 3-4μg 骨骼肌,脑组织,胎盘 2-3μg 人,大鼠,小鼠培养细胞(1×10<sup>6</sup>) 5-7μg,成纤维细胞 5-7μg

应用:

1. 用于 PCR 溶于 8mMNaOH 的 DNA 用 0.1MHEPES 调 pH 至 8.4,取 0.1-1μgDNA 用作模板。
2. 酶切反应用 HEPES 或 1mMEDTA 调节 pH 至适当值。每μgDNA 使用 3-5 单位的酶,80-90%的 DNA 是可消化的。

**实验注意:**

1. DNA 在中间层和有机相中时可在 2-8℃ 保存过夜。
2. NA 沉淀在 75%乙醇中 2-8℃ 可保存几个月。
3. DNA 在 8mMNaOH 溶液中 4℃ 可放置过夜, 如长期保存需用 HEPES 调节 pH 至 7-8 并且加 EDTA 至 1mM 可置于 4℃ 或 -20℃ 长期保存。

**常见问题分析:**

**得率低:**

- A. 样品匀浆和裂解的不彻底
- B. 最终得到的 DNA 沉淀没有完全溶解

A260/A280<1.70: A. 检测吸光度时, RNA 样品没有溶于水, 而溶于了 TE 中

- B. 酚除去的不彻底, 可用 0.1M 柠檬酸钠 (含 10%乙醇) 再洗一遍 DNA 沉淀。

DNA 降解: A. 组织取出后没有马上处理或冷冻

- B. 待提取 RNA 的样品没有保存于 -60 至 -70℃, 而保存在了 -5 至 -20℃
- C. 样品匀浆时使用了高速匀浆仪

**RNA 污染:**

- A. 氯仿分层后水相去除的不干净
- B. DNA 沉淀用 0.1M 柠檬酸钠 (含 10%乙醇) 洗的不彻底

**蛋白质的提取**

准备试剂: 异丙醇含 0.3M 盐酸胍的 95%乙醇无水乙醇 1%SDS

**操作步骤:**

1. 取沉淀 DNA 后剩余的上清, 用异丙醇沉淀蛋白质。每使用 1ml 总 RNA 提取试剂加 1.5ml 异丙醇, 室温放置 10 分钟, 2-8℃ 12000×g 离心 10 分钟弃上清。
2. 用含 0.3M 盐酸胍的 95%乙醇洗涤蛋白质沉淀。每使用 1ml 总 RNA 提取试剂加 2ml 洗涤液, 室温放置 20 分钟, 2-8℃ 7500×g 离心 5 分钟, 弃上清, 重复两次。用 2ml 无水乙醇同样方法再洗一次。
3. 真空抽干蛋白质沉淀 5-10 分钟, 用 1%SDS 溶解蛋白质, 反复吸打, 50℃ 温浴使其完全溶解, 不溶物 2-8℃ 10000×g 离心 10 分钟除去。分离得到的蛋白质样品可用于 Westernblot 或 -5--20℃ 保存备用。

**实验注意:**

1. 蛋白质沉淀可保存在含 0.3M 盐酸胍的 95%乙醇或无水乙醇中 2-8℃ 一个月以上或 -5--20℃ 一年以上。
2. 用 0.1%SDS 在 2-8℃ 透析三次, 10000×g 离心 10 分钟取上清即可用于 Westernblot。

**常见问题分析:**

**得率低:**

- A. 样品裂解或匀浆处理不彻底
- B. 最后得到的蛋白质沉淀未完全溶解

蛋白质降解: 组织取出后没有马上处理或冷冻

电泳时条带变形: 蛋白质沉淀洗涤不充分

### 【注意事项】

1. 本产品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会引起中毒、灼伤及其他身体伤害。使用时应穿戴防护物，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不小心接触到眼睛时，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。
2. 请穿实验服并佩戴一次性手套操作，避免 RNase 污染。
3. 需自备氯仿、异丙醇（新开封或提取 RNA 专用）、75%乙醇（DEPC 处理水配制）DEPC 处理水。
4. 样品用 LS Total RNA Extraction Reagent 匀浆后，如果不加入氯仿进行下游实验，可先 -70℃冻存，可保存一个月以上。
5. RNA 沉淀在 75%乙醇中，4℃可保存 1 周，-20℃可保存 1 年。
6. RNA 半衰期比较短，易降解，建议抽提后尽快进行后续实验。
7. 敬告本产品仅作科研用途，勿用于其他用途。