

一般实验室使用，仅用于**体外**

TRIpure LS Reagent 总RNA抽提试剂

用于各种来源液体或者固体样品总RNA的快速抽提。

目录号: RP1101 50ml 目录号: RP1102 100ml

使用手册

2016年3月，第9版



北京百泰克生物技术有限公司
Bioteke Corporation

TRIpure LS Reagent 抽提指南

警告:

有毒物接触皮肤或者不慎吞服，会导致灼伤。一旦接触皮肤后立即以大量的洗涤剂和清水清洗。若感不适，看医生并寻求苯酚和其他成分的正确治疗方案。

TRIpure LS Reagent在室温下能稳定保存12个月。尽管如此，为达到最佳效果，我们建议保存在2~8℃的环境下。

一般描述:

TRIpure LS Reagent试剂是直接来源于人，动植物，酵母，细菌和病毒的液体样品中提取总RNA的试剂。它在破碎和溶解细胞时能保持RNA的完整性。加入氯仿后离心，样品分成水样层和有机层。RNA存在于水样层中。收集上面的水样层后，RNA可以通过异丙醇沉淀来还原。在除去水样层后，样品中的DNA和蛋白也能相继以沉淀的方式还原。乙醇沉淀能析出中间层的DNA，在有机层中加入异丙醇能沉淀出蛋白。共纯化DNA对于样品间标准化RNA的产量十分有用。

无论是人、动物、植物还是细菌组织，该方法对少量的组织(50-100mg)和细胞(5×10^6)以及大量的组织($\geq 1g$)和细胞($> 10^7$)均有较好的分离效果。TRIpure LS Reagent试剂操作上的简单性允许同时处理多个的样品。所有的操作可以在一小时内完成。TRIpure LS Reagent抽提的总RNA能够避免DNA和蛋白的污染。故而能够作RNA印迹分析、斑点杂交、poly(A)⁺选择、体外翻译、RNA酶保护分析和分子克隆。如果是用于PCR，当两条引物位于单一外显子内时，建议用扩增级的DNase I来处理抽提的总RNA。

TRIpure LS Reagent试剂能促进不同种属不同分子量大小的多种RNA的析出。例如，从大鼠肝脏抽提的RNA琼脂糖凝胶电泳并用溴化乙啶染色，可见许多介于7 kb和15 kb之间

不连续的高分子量条带，两条优势核糖体~5 kb (28S)和~2 kb(18S)，低分子量RNA介于0.1和0.3 kb之间 (tRNA, 5S)。当抽提的RNA用TE稀释时其A260/A280比值 ≥ 1.8 。

预防RNA酶污染:

在抽提RNA过程中任一环节的不正确操作都可能导致RNA酶的污染。由于RNA酶的活性很难完全抑制，预防其污染是十分必要的。在实际的操作中应遵循以下指南：

- * 全程佩戴一次性手套。皮肤经常带有细菌和霉菌，可能污染RNA的抽提并成为RNA酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。

- * 使用灭菌的，一次性的塑料器皿和自动吸管抽提RNA，避免使用公共仪器所导致的RNA酶交叉污染。例如，使用RNA探针的实验室可能用RNA酶A或T1来降低滤纸上的背景，因而某些非一次性的物品（如自动吸管）可能富含RNA酶。

- * 在TRIpure LS Reagent中，RNA是隔离在RNA酶污染之外的。而对样品的后续操作会要求用无RNA酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在150℃的烘箱中烘烤4小时。塑料器皿可以在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。

其他注意事项

- * 当TRIpure LS Reagent用量少于2ml时建议使用清洁的一次性的聚丙烯材质试管。
- * 当TRIpure LS Reagent用量较大时，可以使用玻璃试管(Corex)或聚丙烯材质试管，事先检验以确保该试管可以耐受加入TRIpure LS Reagent和氯仿后12,000 \times g的离心力。不可使用有裂缝或者破损的试管。
- * 离心前小心平衡试管。
- * 离心前玻璃管口必须盖上铝箔并用石蜡膜封口，聚丙烯管必须盖紧。

RNA 抽提操作步骤

注意：用TRIpure LS Reagent抽提RNA时要戴手套和护眼镜。避免接触皮肤和衣服。在化学通风橱完成操作。避免呼吸道吸入。如无例外，所有的操作应该在在15~30℃的条

件下。

实验所需试剂但未提供的物品:

- * 氯仿 * 异丙醇
- * 75%乙醇(用DEPC处理过的水配制)
- * 无RNA酶的水或0.5% SDS溶液[调配无RNA酶的水，将水加入无RNA酶的玻璃瓶中，加入DEPC至0.1% (v/v)。放置过夜并高压灭菌。SDS溶液必须用DEPC处理过并经高压灭菌的水配制。

1. 匀浆化作用

a. 生物液体

每0.25ml液体样品(血清，血浆，脑脊液等等)加入0.75ml TRIpure LS Reagent，用加样枪吹打液体样品几次以帮助裂解样品中细胞。每5~10 $\times 10^6$ 个细胞至少加入0.75ml TRIpure LS Reagent。TRIpure LS Reagent和液体样品的终体积比总是3: 1。

b. 组织

用glass或强力匀浆器搅匀组织样品，每50~100mg组织或者0.25ml组织悬液加0.75ml的TRIpure LS Reagent。一般50~100mg组织体积都要小于0.25ml，如果组织样品的体积小于0.25ml，加入灭菌水将组织样品体积调整到0.25ml以保证体积比例是3: 1。

c. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入0.3ml-0.4ml的TRIpure LS Reagent溶解细胞，用加样枪吹打帮助充分裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的TRIpure LS Reagent量（每10cm²加0.3-0.4ml）。不需要往裂解物里面加水，因为培养板中附着残留的培养液已经充分稀释了TRIpure LS Reagent。

d. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在TRIpure LS Reagent试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每5~10×10⁶的动物细胞，植物或酵母菌细胞或每1×10⁷细菌加0.75ml的TRIpure LS Reagent。和步骤b一样用灭菌水调节样品体积到0.25毫升。在加入TRIpure LS Reagent前应避免洗涤细胞，因为那样会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

可选方案：

当样品富含蛋白质，脂肪，多糖或是细胞外物质例如肌肉，脂肪组织和植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在2~8℃的条件下以12,000×g的离心力离心10分钟，移除匀浆中不溶解的物质，余下的沉淀中包含有细胞外膜，多糖，以及高分子量DNA，而上层的超浮游物含有RNA。在来自于脂肪组织的样品中，大量的脂肪漂在最上层因而应该除掉。在每一个个案中，将清亮的匀浆溶液转移到一干净的试管中加入氯仿并继续进行下述的分离步骤。

2. 分离阶段

将匀浆样品剧烈涡旋混匀至少1分钟，在15-30℃条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。

注意：如需要短期保存，可在完成该步后，转入低温保存或低温运输。

每0.75ml TRIpure LS Reagent加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖，用手用力摇晃试管15秒并将其在30℃下孵育2~15分钟。在2~8℃下以不超过12,000×g的离心力高速冷冻离心15分钟。离心后混合物分成三层：下层苯酚-氯仿层，中间层，上层无色的水样层。RNA无一例外地存在于水样层当中。水样层的容量大约为所加TRIpure LS Reagent容量的70%。

3. RNA的沉淀

将水样层转移到一干净的试管中，如果希望分离DNA和蛋白，有机层同样要予以保留。通过将水样层和异丙醇混合来沉淀RNA。最初均化时的每0.75ml TRIpure LS Reagent对应0.5ml异丙醇。将混合的样品在15-30℃条件下孵育10分钟并在2~8℃下以不超过12,000×g的离心力高速冷冻离心10分钟。RNA沉淀在离心前通常不可见，形成一胶状片状

沉淀附着于试管壁和管底。

4. RNA的漂洗

移去上层悬液。用75%的乙醇洗涤RNA沉淀一次，每0.75ml的TRIpure LS Reagent至少加1ml的75%乙醇。旋涡振荡混合样品并在2~8℃下以不超过7,500×g的离心力高速冷冻离心5分钟。

5. RNA的再溶解

在操作的最后，简单干燥RNA沉淀（空气干燥或真空干燥5~10分钟）不要在真空管里离心干燥RNA。尤为重要，不能让RNA沉淀完全干燥那样会极大地降低它的可溶性。部分溶解的RNA样品其A260/280比值<1.6。用移液管尖分几次移取无RNA酶的水或0.5%SDS溶液来溶解RNA，并在55~60℃下孵育10分钟（当RNA以后要用于酶切反应时，避免使用SDS。）RNA还能被100%甲酰胺（除去离子）再溶解并保存在-70℃。

RNA抽提注意事项：

1.从少量的组织(1~10mg)或细胞(10²~10⁴)中分离RNA样品：调整样品体积到0.25ml，往组织或细胞中加入0.75ml TRIpure LS Reagent。待样品裂解后，加入氯仿并进行步骤2中的抽提操作。在用异丙醇沉淀RNA之前，加入5~10μg无RNA酶的glycogen作为水样层的载体。为降低其黏度在加入氯仿前用26号注射器抽吸两次以切断基因组DNA。Glycogen会留在水样层中并和RNA共析出。在浓缩到4mg/ml之前它不会抑制逆转录反应第一链的合成也不会抑制PCR。

2.在匀浆化后和加入氯仿之前，样品可以在-60~-70℃保存至少一个月。RNA沉淀（步骤4，RNA漂洗）放置于75%的乙醇在2~8℃至少可以保存一周，在-5~-20℃下至少可保存一年。

3.台式离心机最大能达到2,600×g的离心力的，如果将离心时间延长到30~60分钟可以满足步骤2和步骤3中的操作。

疑难解答：

每1ml液体样品或1mg组织或1×10⁶培养细胞预期的RNA产量

- 1.人和动物全血，15~20μg
- 2.人淋巴细胞（约7×10⁷白细胞），60~70μg
- 3.肝和脾，6~10μg
- 4.肾，3~4μg
- 5.骨骼肌和脑组织，1~1.5μg d
- 6.胎盘，1~4μg
- 7.上皮细胞(1×10⁶ cultured cells)，8~15μg
- 8.纤维母细胞(1×10⁶ cultured cells)，5~7μg

抽提得率低

- 1.样品均化或裂解不完全。
- 2.终RNA不完全再溶解。

A260/A280比率<1.65

- 1.在分光光度计测量前用水而不是用TE缓冲液稀释RNA样品。低离子强度和低pH溶液会增加280nm处的光吸收值。
- 2.样品匀浆化时所加的TRIpure LS Reagent量太少。
- 3.匀浆化后样品没有在室温下放置5分钟。
- 4.分离的水样层中污染有苯酚层。
- 5.终RNA没有完全溶解。

RNA降解

- 1.从动物体取下的组织没有立即进行抽提或冰冻保存。
- 2.用于抽提的样品，或抽提的RNA样品保存于-5~-20℃，而不是存放于-60~-70℃。
- 3.细胞经胰酶消化而分散。

- 4.水溶液或试管污染有RNA酶。
- 5.用于琼脂糖凝胶电泳的福尔马林pH低于3.5。

DNA污染

- 1.样品匀浆化时所加的TRIpure LS Reagent量太少。
- 2.用于抽提的样品含有有机溶媒（例如，乙醇，DMSO），强缓冲液，或碱性溶液。

蛋白多糖和多糖污染

下述的对RNA沉淀方法（步骤3）的改进能从抽提的RNA中移去复合污染。以匀浆化时每1ml TRIpure 为例，在水样层中加入0.25ml 异丙醇后再加入0.25ml的高盐溶液(0.8 M 柠檬酸钠和 1.2 M NaCl)。将终溶液混匀，离心并继续进行前述的抽提操作。改进后的沉淀法能有效地析出RNA 而多糖和蛋白多糖仍以可溶的形式留在溶液中。对于含有大量多糖的植物，要抽提其RNA 将改进后的沉淀法和在最初匀浆化时多加一次离心(RNA 抽提指南，可选方案)合并使用是十分必要的。



北京百泰克生物技术有限公司
BioTeke Corporation

地 址：北京海淀区留学人员创业园

电 话：010-62951781

网 址：www.bioteke.com

传 真：010-62951781

Email: info@bioteke.com