

TRIpure Reagent 总 RNA 提取试剂

货号: DP201-01

规格: 100ml

保存: 4°C

【产品概述】

TRIpure Reagent 是一种通用总 RNA 提取试剂。该方法简便、快捷,适用于动植物细胞、组织、酵母细胞以及细菌的总 RNA 抽提,也可从一样品中同时提取 DNA 和蛋白质。其原理是利用异硫氰酸胍/酚/氯仿法,快速裂解细胞,溶解细胞内含物,抑制核酸酶,有效防止 RNA 在提取过程中的降解。加入氯仿后,溶液分为水相和有机相。RNA 保留在上层水相中,分离后可用异丙醇沉淀回收;DNA 存在于中间层,可用乙醇沉淀回收;蛋白质在下层有机相中,用异丙醇沉淀可回收。获得的 DNA 可用作标准参照,比较不同样品的 RNA 得率。TRIpure Reagent 提取的总 RNA 产量大、纯度高,无基因组 DNA 和蛋白质污染,可直接用于 RT-PCR、Northern blot、dot blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护实验和分子克隆等一系列操作。

【保存条件】

4°C 避光密闭保存,有效期一年

【使用方法】

A. 注意事项

1. TRIpure 试剂中含有苯酚等有害物质,应在通风橱内操作并使用个人防护用品如实验服、手套、防护眼镜或面具等,防止皮肤接触和吸入。
2. 预防 RNase 污染:
 - 采用无菌操作规程;经常更换新手套,防止样品由于皮肤携带的细菌、真菌而导致的 RNase 污染。
 - 使用经 DEPC-ddH₂O 处理过的塑料容器和枪头,避免交叉污染。
 - RNA 在 TRIpure 试剂中不会被 RNase 降解。但氯仿抽提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°C 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。
 - 配制溶液应使用无 RNase 的水(制备方法:在去离子水中加入终浓度为 0.05%(v/v)的 DEPC,充分混合,室温或 37°C 放置过夜,高温高压灭菌)
 - 实验前需准备的试剂: RNA 实验专用的氯仿、异丙醇、75%乙醇(DEPC-ddH₂O 配制) DEPC-ddH₂O 或 TE 缓冲液(DEPC-ddH₂O 配制)
 - 匀浆后加氯仿前,样品可在 -80°C 放置一个月以上;溶解在 75%乙醇中的 RNA 可在 4°C 保存一周或 -20°C 保存一年以上。

B. 操作流程

1. 匀浆处理

组织样本:

TRIpure 用量: 每 50~100 mg 组织加 1 ml TRIpure, 样品体积不应超过 TRIpure 体积的 10%。

- 1) 将动物或植物组织切成小块,在液氮中磨碎或用匀浆器匀浆处理。
- 2) 将研磨好的组织粉末快速转入装有 1 ml TRIpure 的 2 ml 离心管中,在涡旋振荡器上迅速振荡混匀,置于冰上,待所有的样品研磨完。
- 3) 裂解产物应呈澄清的透明粘稠液体。对于富含蛋白、脂肪或多糖物质的组织样品如肌肉、脂肪组织和植物结节部位等,匀浆后仍会存留有不溶物质,可于 4°C 12,000x g 离心 10 分钟,然后吸取上清至一新的离心管中。

细胞样本:

- 1) 贴壁细胞: 吸尽培养液,每 10 cm² 培养面积(6 孔板孔或 35 mm 平皿)加入 1 ml TRIpure,用加样器吹打数次,以确保细胞完全裂解,然后转移至离心管中。(注意: TRIpure 的用量应由培养皿表面积决定,而非由细胞数目决定。TRIpure 量不足可能导致提取的 RNA 中有 DNA 污染。)
- 2) 悬浮细胞: 离心收集细胞,吸尽液体,每 5~10 × 10⁶ 动植物或酵母细胞,或每 10⁷ 细菌细胞加入 1 ml TRIpure,用加样器吹打,使其完全裂解,然后转移至离心管中。(注意: 添加 TRIpure 前切勿洗涤细胞,以免 RNA 降解。必要时可以用匀浆器来裂解某些细菌或者酵母细胞。)

2. 液相分离

- 1) 裂解产物于室温（15~30℃）放置 5 分钟，使核酸-蛋白复合物完全分离。（注：此时样品可在-80℃长期保存。）
- 2) 每1 ml TRIpure 加入 0.2 ml 氯仿，盖紧管盖，剧烈振荡 15 秒钟，室温放置 2~3 分钟。
- 3) 4℃ ≤12,000x g 离心 15 分钟，样品会分成三层：桔黄色的下层有机相，中间层和无色的上层水相。
- 4) 吸取含总 RNA 的上层水相至一新的离心管中，水相的体积约为所用 TRIpure 试剂的 60%。

3. RNA 回收

- 1) 每1 ml TRIpure 的最初使用量加入 0.5 ml 异丙醇，颠倒数次混匀，室温放置 10 分钟。
- 2) 4℃ ≤12,000x g 离心 10 分钟，弃除上清，可见胶状的 RNA 沉淀。
- 3) 每1 ml TRIpure 的最初使用量加入 1 ml 75%乙醇，颠倒数次混匀，洗涤沉淀。
- 4) 4℃ ≤7,500x g 离心 5 分钟，弃除上清。
- 5) 室温倒置 5~10 分钟晾干或真空抽干（不要使用真空干燥离心机，以免 RNA 过干，难以溶解）
- 6) 加入适量（如25 μl）DEPC-ddH₂O 或 TE 缓冲液，用加样器吹打数次溶解 RNA。
- 7) 通过 RNA 电泳以及紫外分光光度计检测，确定 RNA 的浓度、纯度和完整性。
- 8) 分装后-80℃保存，避免反复冻融。

【RNA 提取常见问题及解决方案】

问题	可能原因	解决方案
产量低	样品裂解或匀浆处理不彻底	加入 TRIpure 后应彻底匀浆，植物和酵母细胞应在液氮中充分研磨
	RNA 终产物溶解不完全	注意不使沉淀的 RNA 过分干燥；对难溶的沉淀可于 50-60℃ 加热 5 分钟助溶
RNA 降解	组织或细胞样品取出后没有马上处理或于-80℃冷冻	采用新鲜材料；不能及时提取 RNA 的样品应于-80℃或液氮冷冻保存
	提取的 RNA 长期保存置于-20℃	应置于-80℃长期保存
	细胞在胰酶处理时被破坏	避免使用胰蛋白酶，直接使用 TRIpure 裂解细胞
	溶液或离心管未经 RNase 去除处理	氯仿抽提之后的所有步骤都需采用无 RNase 的试剂和容器
	电泳时使用的甲酰胺 pH 值低于 3.5	正确配制 RNA 变性凝胶
OD _{260/280} <1.65	检测吸光度时，RNA 样品溶于水中	使用 TE 稀释 RNA 样品进行检测
	样品匀浆时的 TRIpure 用量过少	通常向每 50 mg 组织、每 10 cm ² 培养面积、或每 5~10×10 ⁶ 细胞中加入 1 ml TRIpure；每 0.25 ml 体液样品中加入 0.75 ml TRIpure LS
	匀浆后样品未在室温放置 5 分钟	匀浆后室温放置 5 分钟
	苯酚污染（270 nm 强吸收峰）	4℃下离心；小心吸取上层水相，避免混有有机相；对污染的样品使用乙醇沉淀去除苯酚
	最后得到的 RNA 沉淀未完全溶解	避免使用真空干燥离心机干燥 RNA 沉淀；对难溶的沉淀可于 50-60℃加热 5 分钟助溶
OD _{260/280} >2.0	RNA 降解使 OD ₂₆₀ 值升高	尽可能采取一切避免 RNA 降解的措施
DNA 污染	样品匀浆时的 TRIpure 用量过少	通常向每 50 mg 组织、每 10 cm ² 培养面积、或每 5~10×10 ⁶ 细胞中加入 1 ml TRIpure；每 0.25 ml 体液样品中加入 0.75 ml TRIpure LS
	起始样品中含有溶剂（如乙醇、DMSO 等） 强缓冲液或碱性溶液	使用 DNase I 处理 RNA 溶液

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。