

M5 Total RNA Extraction Reagent (TRlgent) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Total RNA Extraction Reagent (TRlgent)	100ml	MF034-01

【储存条件】 室温下能稳定保存 12 个月。为达到最佳效果，建议保存在 2~8°C。

【产品简介】

TRlgent 是广谱型总 RNA 提取试剂。实验操作快速方便，颜色鲜明，便于分层。本试剂适用范围广泛，可以从动物组织、植物材料、各种微生物及培养细胞等样品中提取总 RNA。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。样品在 TRlgent 中被充分裂解的同时能够最大限度地保证 RNA 的完整性。在加入氯仿离心后，溶液会分成三层：上层无色水相、中间层和下层红色有机相，RNA 分布在上清层中。收集上清层后，经异丙醇沉淀便可以回收得到总 RNA。提取的总 RNA 完整性好，无蛋白和 DNA 污染，可用于各种分子生物学常规实验，如 RT-PCR、Real-time RT-PCR、Northern blot、Dot Blot、体外翻译等。TRlgent 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锭染色，可见许多介于 7kb 和 15 kb 之间不连续的高分子量条带(mRNA 和 hnRNA 成分)，两条优势核糖体~2 kb(28S)和~1 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 。

【注意事项】

- 本品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会导致中毒、灼伤以及其他身体伤害。使用本制品时应穿戴防护物品，如防护服、手套、眼罩、面罩等。如果不慎接触，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。**
- 样品匀浆后，如果不即刻加入氯仿之前，置于 -70°C 下可放置一个月以上。保存在 75%乙醇中的 RNA 沉淀，2-8°C 可以保存一周，-20°C 条件下可以保存 1 年。RNA 半衰期比较短，容易降解，建议提取后尽快进行后续实验，如反转录成 cDNA，Northern Blot 等。
- 若下游实验对 DNA 非常敏感，建议用 RNase free DNase I 对 RNA 进行处理。
- 自备试剂：氯仿、异丙醇（新开封或提取 RNA 专用）、75%乙醇(用 DEPC 处理过的水配制)、RNase free water 或者 DEPC 处理过的水。

【操作步骤】

<友情提示>: 1) 抽提 RNA 时要戴手套和护眼罩。避免接触皮肤和衣服。

2) 在化学通风橱完成操作。避免呼吸道吸入。

3) 如无特殊说明，所有的操作应该在在 15~30°C 的室温条件下。

1. 匀浆

a. 植物组织：取新鲜植物组织在液氮中充分研磨或将植物组织剪碎后直接在 TRlgent 中迅速研磨，每 50-100mg 组织加入 1ml TRlgent，混匀。注意：样品体积一般不要超过 TRlgent 体积的 10%。

b. 动物组织：取新鲜或 -70°C 冻存动物组织尽量剪碎，每 30-100mg 组织加入 1ml TRlgent，匀浆仪进行匀浆处理。或在液氮中研磨后加入 TRlgent 1ml 混匀。注意：样品体积一般不要超过 TRlgent 体积的 10%。

c. 单层培养细胞：尽量去除干净残留培养液后直接往直径 3.5 cm 的培养板中加入 1ml 的 TRlgent 覆盖并反复吹打裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的 TRlgent 量（每 10cm² 加 1ml）。当 TRlgent 量不足时可导致抽提的 RNA 中污染有 DNA。

<注意>：贴壁培养细胞往往不能完全从培养瓶/皿脱落，这并不意味着裂解不完全，此时细胞膜实际已经完全破裂开并已释放出全部 RNA，继续做即可。

d. 细胞悬液：离心收集细胞。在 TRlgent 试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每 $5 \sim 10 \times 10^6$ 的动物细胞，植物或酵母菌细胞或每 1×10^7 细菌加 1ml 的 TRlgent。在加入 TRlgent 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。

2. 将匀浆样品剧烈震荡后在室温条件下放置 5 分钟以使核蛋白体完全解离。

3. 可选步骤：在 4°C 的条件下以 12,000 rpm 的离心力离心 10 分钟，取上清。

如样品中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或肌肉，植物的块茎结节等可离心去除。离心后的沉淀中包含有细胞外膜，多糖，以及高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织的样品时，上层是大量油脂应除去。取澄清的匀浆液进行下一步。

4. 每 1ml TRIgent 加 0.2ml 氯仿。盖紧管盖，剧烈震荡 15 秒并将其在室温下放置 2~3 分钟。
5. 在 4°C 12,000 rpm 的离心力高速冷冻离心 10-15 分钟。离心后混合物分成三层：下层红色有机苯酚氯仿层，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 TRIgent 容量的 50-60%。（有机层和中间层是蛋白和 DNA，如果需要提取，请联系我们索取提取方法）。
6. 将水样层转移到一干净的离心管中，加入等体积异丙醇。颠倒混匀后室温放置 10 分钟。
<注意：RNA 沉淀在离心前通常不可见，离心后在管侧和管底形成胶状沉淀>。
7. 在室温或者 4°C 12,000 rpm 离心 10 分钟，弃上清。
8. 加入 75%乙醇洗涤沉淀。每使用 1 ml TRIgent 用 1ml 75%乙醇对沉淀进行洗涤。
9. 在室温或者 4°C 12,000 rpm 离心 3 分钟，弃上清，注意不要丢失 RNA 沉淀。
<注意：剩余的少量液体可短暂离心，然后用枪头吸出，注意不要吸弃沉淀>。
10. 室温放置 2-3 分钟，晾干。加入 30-100 μ l RNase free water，充分溶解 RNA，得到的 RNA 保存在 -70°C，防止降解。
<注意：沉淀不要过分干燥，以免难于溶解>。

【附注一 RNA 纯度及浓度检测】

A、完整性： RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳（电泳条件：胶浓度 1.2%；0.5 \times TBE 电泳缓冲液；150v，15 分钟）检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA，电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。动物 rRNA 大小分别约为 5 kb 和 2kb，分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍，否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

B、纯度： OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数（10mM Tris, pH7.5）在 2.1-2.2 之间（100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右，很多公司无法达到这个标准，所以 1.9-2.0 就凑合用了，但是我们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2）。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品，假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数 1.8-2.1 之间，在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间，但这并不表示 RNA 不纯。

C、浓度： 取一定量的 RNA 提取物，用 RNase-free 水稀释 n 倍，用 RNase-free 水将分光光度计调零，取稀释液进行 OD₂₆₀, OD₂₈₀ 测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度（ng/ μ l）= (OD₂₆₀) \times （稀释倍数 n） \times 40。

【附注二 TRIgent 提蛋白的操作流程】

一、操作步骤

1. 样品加氯仿分层后，移去上层水相（该水相里就是 RNA，可照常继续进行 RNA 的提取），加 0.3ml 乙醇沉淀中间层和有机相中的 DNA，涡旋混合，室温放置 3 分钟，2-8°C 不超过 12000rpm 离心 5 分钟。【注：这一步同时可以除去未完全消化的残渣】
2. 小心吸出沉淀后的上清，加 1.5ml 异丙醇沉淀蛋白质。室温放置 10 分钟，2-8°C 12000rpm 离心 10 分钟弃上清。
3. 加 2ml 含 0.3M 盐酸胍的 95%乙醇洗涤蛋白质沉淀。室温放置 20 分钟，2-8°C 7500rpm 离心 5 分钟，弃上清，重复两次。
4. 用 2ml 无水乙醇同样方法再洗一次。
5. 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°C 温浴使其完全溶解，不溶物 2-8°C 10000rpm 离心 10 分钟除去。分离得到的蛋白质样品可用于 Western Blot 或 -5 至 -20°C 保存备用。

注意： 无水乙醇很容易挥发，所以几分钟就能抽干；没有真空抽干机也无所谓，把无水乙醇倒掉，开盖子静置几分钟就行了。这一步干燥千万不能太干了，否则很难溶解。在 50 度水浴中过夜，或者每水浴 30 分钟就放在超声清洗机里清洗 10 分钟——虽然不是专门用来粉碎细胞的超声，但毕竟是超声波，还是蛮有效果的。

二、注意事项：

- 1.以上各试剂的用量都是以 1mLTRIgent 为准，TRIgent 体积变化，各试剂用量随之等比例变化。
- 2.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 至-20℃一年以上。
3. 这一步可省去：用 0.1% SDS 在 2-8℃透析三次，10000rpm 离心 10 分钟取上清即可用于 Western Blot。

三、常见问题分析：

- 1、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。
- 2、蛋白质降解：组织取出后没有马上处理或冷冻；
- 3、电泳时条带变形：蛋白质沉淀洗涤不充分

【附注三 TRIgent 提 DNA 的操作流程】

1. 样品加氯仿分层后,移去上层水相(该水相里就是 RNA,可照常继续进行 RNA 的提取),加 0.3ml 乙醇沉淀中间层和有机相中的 DNA,涡旋混合,室温放置 3 分钟,2-8℃不超过 12000rpm 离心 5 分钟。**注意：这一步同时可以除去未完全消化的残渣。**
2. 将酚-乙醇上层液移除,如果要求提取蛋白就将上层液移到一个新的管中。上层液可以在-70℃条件下保存几个月。
3. 继续用 DNA 洗脱步骤洗脱 DNA 颗粒：
 - 3a. 每 1ml TRIgent 试剂用 1ml 柠檬酸钠乙醇溶液(10%乙醇加入 0.1M 的柠檬酸钠,PH 为 8.5),重新溶解 DNA;
 - 3b. 室温下孵育 30min,偶尔轻柔的颠倒混合物,**注意：DNA 可以储存在柠檬酸钠和乙醇溶液中至少 2 小时;**
 - 3c. 2-8℃以 12000rpm 离心 5min 孵育,移除和废除上清液。
 - 3d. (可选)重复洗脱(步骤 3a-3c)。**注意：大块的 DNA 沉淀(>200ug)必须要重复洗脱。**
4. 每 1ml TRIgent 试剂加 1.5ml 的 75%的乙醇,重新溶解 DNA(注意 DNA 样本可以储存于 4℃下的 75%乙醇几个月)。
5. 室温下孵化 10-20min,偶尔轻柔的颠倒混匀管。2-8℃以 12000rpm 离心 5min 孵育,移除和废除上清液。
6. 通过空气或者真空干燥 DNA 沉淀 5-10min。不要让 DNA 沉淀太干燥,不要通过真空离心干燥 DNA 沉淀。
7. 重悬溶解 DNA：
 - 8a. 每 50-70mg 的组织或者 1×10^7 的细胞加 8mM 的 NaOH 0.3-0.6ml。
注意：因为提取的 DNA 在水或者 Tris 缓冲液中不能很好地重新混匀,强烈建议在弱碱条件下悬浮 DNA。
 - 8b. 4℃下以 12000rpm 离心样本 10min,来移除任何不溶的材料
 - 8c. 将包含 DNA 的上清液转移至一个新的管中,用 HEPES 来调节需要的 PH,进行下游选择的应用。DNA 可以在 4℃下储存过夜,但是为了长期存储,用 HEPES 调节 PH 至 7-8,加 1mM 的 EDTA,储存在 4℃或者 20℃下。

【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。