

TRNpure Total RNA Kit

TRNpure 高纯总 RNA 提取试剂盒

目录号

RHYC03

试剂盒组成

Component	RHYC03 (50 preps)
Buffer RZ	50 ml
Buffer RW1	25 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
RNase-free H ₂ O	10 ml
Spin Columns RA with Collection Tubes	50

保存方法

Buffer RZ 常温运输，4°C避光保存，其它组分 RT（15-30°C）。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品介绍

改进的异硫氰酸胍/酚一步法迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，用乙醇调节结合条件后，总 RNA 选择性吸附于离心柱内硅基质膜上，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。提取的 RNA 纯度高，质量稳定可靠，可直接应用于下 RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot 和体外翻译等实验。

产品特点

1. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好和离心柱纯度高的优点，不需要异丙醇沉淀，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不容易溶解的问题。
2. 优化的裂解液 RZ 配方，可有效去除基因组 DNA 污染，不需要进行 DNase 消化，并能有效去除 5S 在总 RNA 中的含量，进一步提高了纯度。
3. 多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 1.9-2.2，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 等各种实验。

自备试剂

无水乙醇

实验前准备及重要注意事项

1. 使用 RNase-free 的离心管和吸头；避开经常使用 RNase 的区域，以免 RNase 气溶胶污染。
2. 提取的样品避免反复冻融，否则影响 RNA 提取得率和质量。
3. 第一次使用 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。
4. 加入 Buffer RZ 匀浆后，加氯仿前，样品可在-70°C保存一个月以上。

操作步骤

1. 样本处理

a)动物/植物组织:

将组织在液氮中充分研磨，每 50-100 mg 组织中加入 1 ml Buffer RZ 匀浆。样品体积不应超过 Buffer RZ 体积的 10%。

b)单层培养细胞:

向直径 3.5 cm 的培养板/瓶中加入 1 ml Buffer RZ（按培养板面积而不是细胞数决定加入量，每 10 cm²加入 1 ml），用移液器轻轻反复吸打裂解细胞至溶液透明。

注意：如果 Buffer RZ 加入量不足可能导致提取的 RNA 中污染有 DNA。

c) 细胞悬液:

离心取细胞, 弃上清, 每 $5-10 \times 10^6$ 动物/植物/酵母细胞或每 10^7 细菌细胞加入 1 ml Buffer RZ 混匀裂解细胞。加入 Buffer RZ 前不要洗涤细胞, 以免降解 mRNA。一些酵母和细菌细胞可能需要匀浆仪处理。

2. 将匀浆样品在室温 ($15-30^\circ\text{C}$) 放置 5 min, 使得核酸蛋白复合物完全分离。
3. **可选步骤:** 4°C , 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 5 min, 取上清, 转移至一个新的 RNase-free 离心管中。

注意: 如果样品中含有较多蛋白、脂肪、多糖或肌肉、植物结节部分等, 可离心除去。离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量的 DNA, 上清中含有 RNA。处理脂肪组织样品时, 上层是大量油脂, 应除去, 取澄清的匀浆溶液进行下一步操作。

4. 加入 200 μl 氯仿, 盖好管盖, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 3 min。
 5. 4°C , 12,000 rpm 离心 10 min。匀浆会分为三层: 下层有机相, 中间层和上层无色的水相。RNA 存在于水相中。水相层的体积大约为所加 Buffer RZ 体积的 50%, 小心地把水相转移到新的离心管中 (不要碰触中间层)。
 6. 缓慢加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 反复吸打混匀 (可能会出现沉淀, 不影响后续操作), 将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns RA) 中, 若一次不能将全部溶液加入吸附柱中, 请分两次转入。12,000 rpm 离心 30 s, 弃废液。
 7. 向吸附柱 RA 中加入 500 μl Buffer RW1, 12,000 rpm 离心 30 s, 弃废液。
 8. 向吸附柱 RA 中加入 600 μl Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 s, 弃废液。
 9. 重复步骤 8。
 10. 将吸附柱放回空收集管内, 12,000 rpm 离心 2 min。
注意: 这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇, 乙醇残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。
 11. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 30-100 μl RNase-Free H_2O , 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 得到 RNA 溶液, -70°C 保存, 防止降解。
注意: RNase-Free H_2O 体积不应少于 30 μl , 体积小影响回收效率。如果要提高 RNA 的产量, 可用 30-50 μl 新的 RNase-Free H_2O 重复步骤 11; 如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 11。
-