

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。

- 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。
 - 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。
 - 加入 200 μl 氯仿, 盖好管盖, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 3 min。
 - 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)。
 - 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。
 - 向吸附柱 RA 中加入 500 μl Buffer RW1, 12,000 rpm 离心 30 s, 弃废液。
 - 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。
 - 重复步骤 8。
 - 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)。
 - 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。
-