

TRNpure Reagent
TRNpure 总 RNA 提取试剂

目录号: RHYC01

制品内容

TRNpure Reagent	100 ml
-----------------	--------

*本产品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会引起中毒、灼伤及其他身体伤害。使用时应穿戴防护物，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不小心接触到眼睛时，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。

保存方法

TRNpure Reagent 可常温运输，4°C避光保存一年，常温保存 3 个月不影响使用。

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

TRNpure Reagent 是一种用于各种动植物组织、细菌、细胞总 RNA 抽提试剂，具有极强的裂解能力，可在短时间内裂解细胞和组织样本，并有效抑制样本中 RNA 的降解，保持 RNA 的完整性。样品在该试剂中能够充分裂解，之后加入氯仿离心分层，形成上清层、中间层和有机层(鲜红色下层)，RNA 分布在上层水相中，收集上清层后，经异丙醇沉淀便可得到总 RNA。提取的总 RNA 纯度高，基本不含蛋白质及基因组 DNA，可直接用于 Northern、点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RT-PCR、poly(A)+选择、RNA 酶保护分析以及构建 cDNA 文库等多种分子生物学实验。

此外，样品中的 DNA 和蛋白也能以沉淀的方式还原。乙醇沉淀能析出中间层的 DNA，而在有机层中加入异丙醇能沉淀出蛋白。

TRNpure 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锭染色，可见许多介于 7 kb 和 15 kb 之间不连续的高分子量条带 (mRNA 和 hnRNA 成分)，两条优势核糖体约 5 kb (28S) 和约 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 \geq 1.8。

注意事项

1. 需自备氯仿、异丙醇(新开封或提取 RNA 专用)、75%乙醇(DEPC 处理水配制)、RNase-free H₂O。
2. 样品用 TRNpure Reagent 匀浆后，如果不加入氯仿进行下游实验，可先-70℃冻存，可保存一个月以上。
3. RNA 沉淀在 75%乙醇中，4℃可保存 1 周，-20℃可保存 1 年。
4. RNA 半衰期比较短，易降解，建议抽提后尽快进行后续实验。

标准抽提步骤

1. 样品匀浆

a) 动物/植物组织:

将组织在液氮中充分研磨，每 30-100 mg 组织中加入 1 ml TRNpure Reagent 匀浆。

注意：样品体积不要超过 TRNpure Reagent 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 TRNpure Reagent (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 TRNpure Reagent 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 10⁶ 动物/植物/酵母细胞或每 10⁷ 细菌细胞加入 1 ml TRNpure Reagent 混匀裂解细胞。加入 TRNpure Reagent 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。

d) **血液:**

直接取新鲜血液，加入 3 倍体积 TRNpure Reagent（如 0.25 ml 血液+0.75 ml TRNpure Reagent），充分振荡混匀。

2. 将匀浆样品在室温（15-30°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(~13,400×g)离心 5 min，取上清，转入一个新的 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 TRNpure Reagent 体积的 50%，把水相转移到新的离心管中。
 6. 在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇，颠倒混匀，室温放置 10 min。
 7. 4°C，12,000 rpm 离心 10 min，弃上清，一般在离心后在离心管底部会出现 RNA 沉淀。
 8. 加入 75%乙醇（用 RNase-free 水配制）洗涤沉淀。每使用 1 ml TRNpure Reagent 用 1 ml 75%乙醇对沉淀进行洗涤。
 9. 4°C 12,000 rpm 离心 3 min，小心吸弃上清，注意不要吸弃 RNA 沉淀。
 10. 打开离心管盖，室温干燥沉淀几分钟。沉淀干燥后加入适量 RNase-free 水，充分溶解 RNA，得到的 RNA 保存在-70°C，防止降解。
注意: 沉淀不要完全干燥，也不能加热干燥或离心沉淀，否则 RNA 会很难溶解。
-