

版本号: DP121221

TRNzol-A⁺ Reagent

TRNzol-A⁺总RNA提取试剂

目录号: DP421

产品内容

目录号	产品组成
DP421	100 ml

产品简介

TRNzol-A⁺是天根公司最新研发的总RNA提取产品, 具有更强的裂解能力, 更高的灵敏度。可从细胞和组织中提取总RNA的试剂, 在样品裂解或匀浆过程中, TRNzol-A⁺可保持RNA完整性, 同时裂解细胞, 溶解细胞内含物。

TRNzol-A⁺试剂既可用于少量样品 (50-100 mg组织、 5×10^6 细胞) 的总RNA提取, 也可用于大量样品 (≥ 1 g组织或 $\geq 10^7$ 细胞) 的总RNA提取, 对动物、植物组织提取都适用, 可同时处理大量不同样品。一个小时内即可完成反应, 提取的总RNA没有DNA和蛋白的污染, 可用于Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆。

储存条件

2-8°C 避光保存12个月

注意事项

1. 匀浆后，加氯仿前，样品可在-70℃放置一个月。
2. RNA沉淀可以保存在75%乙醇中，2-8℃一个星期以上或-20℃一年。
3. 若提取细菌RNA，推荐应用RNAprep pure培养细胞/细菌总RNA提取试剂盒（目录号：DP430）。

预防RNase污染，应注意以下几方面：

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用RNase-Free的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在TRNzol-A⁺试剂中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用RNase-Free的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用RNase-Free ddH₂O。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(V/V)，放置过夜，高压灭菌）。

RNA提取操作步骤

准备试剂：氯仿、异丙醇、RNase-Free ddH₂O、75%乙醇(用RNase-Free ddH₂O配制)。

1. 样品处理

- a. 植物组织：以叶片RNA提取为例。取新鲜叶片在液氮中充分研磨或将叶片剪碎后直接在TRNzol-A⁺中研磨，研磨要迅速，最好不要超过1 min。大约100 mg 叶片使用1 ml TRNzol-A⁺。
 - b. 动物组织：以鼠肝脏RNA提取为例。取新鲜或-70℃冻存组织，每30-50 mg组织加入1 ml TRNzol-A⁺，用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积一般不要超过TRNzol-A⁺体积的10%。
 - c. 单层培养细胞：单层贴壁细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 1×10^7 ）：可直接在培养容器中裂解（容器体积不超过10cm²），或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀。（在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法）。
 - 1) 直接裂解法：直接在培养板中加入TRNzol-A⁺裂解细胞，每10 cm²面积加入1 ml TRNzol-A⁺。用取样器吹打几次。注意：TRNzol-A⁺加量根据培养板面积决定，不是由细胞数决定。如果TRNzol-A⁺加量不足，可能导致提取的RNA中有DNA污染。
-

2) 胰蛋白酶处理法: 确定细胞数量, 吸除培养基, 用PBS洗涤细胞, 吸除PBS, 向细胞中加入含有0.1-0.25%胰蛋白酶的PBS处理细胞, 当细胞脱离容器壁时, 加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶, 将细胞溶液转移至RNase-Free的离心管中, 300×g离心5 min, 收集细胞沉淀, 仔细吸除所有上清。

注意: 收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净, 否则会导致裂解不完全, 造成RNA的产量降低。

d. 细胞悬液: 离心取细胞。每 5×10^6 - 10^7 动物细胞和植物细胞加入1 ml TRNzol-A⁺。加入TRNzol-A⁺前不要洗涤细胞, 以免降解mRNA。

e. 血液处理: 直接取新鲜的血液, 加入3倍体积TRNzol-A⁺(推荐0.25ml全血加入0.75 ml TRNzol-A⁺), 充分振荡混匀。

2. 将匀浆样品在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10 min, 取上清。

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, 可离心去除。

离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量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. 每使用1 ml TRNzol-A⁺加0.2 ml氯仿, 盖好管盖, 剧烈振荡15 sec, 室温放置3 min。

注意: 如不能旋涡混匀, 可手动快速颠倒混匀2 min。

5. 4°C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10-15 min。样品会分成三层: 黄色的有机相, 中间层和上层无色的水相, RNA主要在水相中, 把水相(约500 μl)转移到新管中。(如果要分离DNA和蛋白质, 可向天根公司索取提取方法)。

6. 在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇, 混匀, 室温放置20-30 min。

7. 4°C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min, 去上清。离心前RNA沉淀经常是看不见的, 离心后在管侧和管底形成胶状沉淀。

8. 加入1 ml 75%乙醇(用RNase-Free ddH₂O配制)洗涤沉淀。每使用1 ml TRNzol-A⁺至少用1 ml 75%乙醇对沉淀进行洗涤。

9. 4°C 5,000 rpm(~2,300×g)离心3 min。倒出液体，注意不要倒出沉淀，剩余的少量液体短暂离心，然后用枪头吸出，注意不要吸弃沉淀。
10. 室温放置晾干（不要晾的过干，RNA完全干燥后会很难溶解，大约晾干2-3 min左右即可），根据实验需要，加入30-100 μl RNase-Free ddH₂O，反复吹打、混匀，充分溶解RNA。

不同组织或细胞RNA提取预期得率

植物叶片	100-200 μg/g 叶片
动物组织	6-10 μg/mg 肝脏组织
动植物培养细胞	5-10 μg/10 ⁶ 细胞
血液	3-5 μg/ml 人类全血

问题指南

低得率	<ul style="list-style-type: none"> A. 样品裂解或匀浆处理不彻底。 B. 最后得到的RNA沉淀未完全溶解。
$A_{260}/A_{280} < 1.65$	<ul style="list-style-type: none"> A. 检测吸光度时，RNA样品不是溶于TE，而是溶于水。低离子浓度和低pH条件下，A280值会较高。 B. 样品匀浆时加的试剂量太少。 C. 匀浆后样品未在室温放置5 min。 D. 水相中混有有机相。 E. 最后得到的RNA沉淀未完全溶解。
RNA降解	<ul style="list-style-type: none"> A. 组织取出后没有马上处理或冷冻。 B. 样品或提取的RNA沉淀保存于-5°C - -20°C，未在-60°C - -70°C保存。 C. 细胞在胰蛋白酶处理时被破坏。 D. 溶液或离心管未经RNase去除处理。 E. 电泳时使用的甲酰胺pH低于3.5。
DNA污染	<ul style="list-style-type: none"> A. 样品匀浆时加的试剂体积太少。 B. 样品中含有组织溶剂(如乙醇，DMSO等)，强缓冲液或碱性溶液。
蛋白和多糖污染	<ul style="list-style-type: none"> A. 样品中蛋白、多糖含量高。 B. 样品量太大。 C. 水相中混有有机相。