

总 RNA 快速提取试剂盒

Total RNApure Kit

(非离心柱型)

目录号: **zp402**

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP402-1 (20 次)	ZP402-2 (50 次)	ZP402-3 (100 次)
RNApure	20 ml	50 ml	100 ml
异丙醇	15 ml	30 ml	60 ml
75%乙醇	30 ml	60 ml	120 ml
RNase-free ddH ₂ O	10 ml	15 ml	30 ml
50×TAE (RNase-free)	25 ml	25 ml	60 ml
6×RNA 上样缓冲液	200 ul	200 ul	1 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

备注: 客户需要自备氯仿

储存条件:

- 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在 37℃ 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
- 不合适的储存于低温 (4℃ 或者 -20℃) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果, 因此储存在室温下 (15℃ - 25℃)。RNApure 可以常温运输, 收到后 **4℃ 避光保存**。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍:

RNApure Reagent试剂是直接来源于人, 动植物, 酵母, 细菌和病毒的液体样品中提取总RNA的试剂。它在破碎和溶解细胞时能保持RNA的完整性。加入氯仿后离心, 样品分成水样层和有机层。RNA存在于水样层中。收集上面的水样层后, RNA可以通过异丙醇沉淀来还原。在除去水样层后, 样品中的DNA和蛋白也能相继以沉淀的方式还原。乙醇沉淀能析出中间层的DNA, 在有机层中加入异丙醇能沉淀出蛋白。共纯化DNA对于样品间标准化RNA的产量十分有用。

无论是人、动物、植物还是细菌组织, 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。RNApure Reagent试剂操作上的简单性允许同时处理多个的样品。所有的操作可以在一小时内完成。RNApure Reagent 抽提的总 RNA 能够避免 DNA 和蛋白的污染。故而能够作 RNA 印迹分析、斑点杂交、poly(A)+选择、体外翻译、RNA 酶保护分析和分子克隆。如果是用于 PCR, 当两条引物位于单一外显子内时, 建议用扩增级的 DNase I 来处理抽提的总 RNA。

RNApure Reagent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啶染色, 可见许多介于7 kb和15 kb之间不连续的高分子量条带, 两条优势核糖体~5 kb (28S)和~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 ≥ 1.8 。

❖ 注意事项:

1. 当RNApure Reagent用量少于2ml时建议使用清洁的一次性的聚丙烯材质试管。
2. 当RNApure Reagent用量较大时, 可以使用玻璃试管(Corex)或聚丙烯材质试管, 事先检验以确保该试管可以耐受加入RNApure Reagent和氯仿后 $12,000 \times g$ 的离心力。不可使用有裂缝或者破损的试管。

3. 离心前小心平衡试管。
4. 离心前玻璃管口必须盖上铝箔并用石蜡膜封口，聚丙烯管必须盖紧。
5. 从少量的组织 ($1\sim 10\text{mg}$) 或细胞 ($10^2\sim 10^4$) 中分离 RNA 样品: 调整样品体积到 0.25ml , 往组织或细胞中加入 0.75ml RNeasy Lysis Reagent。待样品裂解后, 加入氯仿并进行步骤 2 中的抽提操作。在用异丙醇沉淀 RNA 之前, 加入 $5\sim 10\text{ }\mu\text{g}$ 无 RNA 酶的 glycogen 作为水样层的载体。为降低其黏度在加入氯仿前用 26 号注射器抽吸两次以切断基因组 DNA。Glycogen 会留在水样层中并和 RNA 共析出。在浓缩到 4mg/ml 之前它不会抑制逆转录反应第一链的合成也不会抑制 PCR。
6. 在匀浆化后和加入氯仿之前, 样品可以在 $-60\sim -70^{\circ}\text{C}$ 保存至少一个月。RNA 沉淀 (步骤 4, RNA 漂洗) 放置于 75% 的乙醇在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 至少可以保存一周, 在 $-5\sim -20^{\circ}\text{C}$ 下至少可保存一年。
7. 台式离心机最大能达到 $2,600\times g$ 的离心力的, 如果将离心时间延长到 $30\sim 60$ 分钟可以满足步骤 2 和步骤 3 中的操作。

❖ **RNA 抽提操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)**

提示:

用 RNeasy Lysis Reagent 抽提 RNA 时要戴手套和护目镜。避免接触皮肤和衣服。在化学通风橱完成操作。避免呼吸道吸入。如无例外, 所有的操作应该在在 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 的条件下。

1. 匀浆化作用

a. 生物液体

每0.25ml液体样品(血清, 血浆, 脑脊液等等)加入1 ml RNApure Reagent, 用加样枪吹打液体样品几次以帮助裂解样品中细胞。每 $5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞至少加入1 ml RNApure Reagent。对于含有高污染物样品如全血样品, 可以用灭菌水按照1: 1比例稀释一倍后开始提取。RNApure Reagent 和液体样品的终体积比总是3: 1。

b. 组织

用glass或强力匀浆器搅匀组织样品, 每50~100mg组织或者0.25ml组织悬液加1 ml的RNApure Reagent。一般50~100mg组织体积都要小于0.25ml, 如果组织样品的体积小于0.25ml, 加入灭菌水将组织样品体积调整到0.25ml以保证体积比例是3: 1。

c. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入0.3ml-0.4ml的RNApure Reagent溶解细胞, 用加样枪吹打帮助充分裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的RNApure Reagent量(每 10cm^2 加0.3-0.4ml)。不需要往裂解物里面加水, 因为培养板中附着残留的培养液已经充分稀释了RNApure Reagent。

d. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在 RNApure Reagent 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RNApure Reagent。和步骤b一样用灭菌水调节样品体积到0.25毫升。在加入RNApure Reagent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。

可选方案：当样品富含蛋白质，脂肪，多糖或是细胞外物质例如肌肉，脂肪组织和植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在2~8° C的条件下以12,000×g的离心力离心10分钟，移除匀浆中不溶解的物质，余下的沉淀中包含有细胞外膜，多糖，以及高分子量DNA，而上层的超浮游物含有RNA。在来自于脂肪组织的样品中，大量的脂肪漂在最上层因而应该除掉。在每一个案中，将清亮的匀浆溶液转移到一干净的试管中加入氯仿并继续进行下述的分离步骤。

2. 分离阶段

将匀浆样品在15-30° C条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。每1 ml RNApure Reagent加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖，用手用力摇晃试管15秒并将其在室温放置2分钟。在2~8° C下以不超过12,000×g的离心力高速冷冻离心15分钟。离心后混合物分成三层：下层苯酚-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RNApure Reagent 容量的60%。

3. RNA 的沉淀

将水相层转移到一干净的试管中，如果希望分离DNA和蛋白，有机层同样要予以保留。400-500ul水相，加入0.5ml异丙醇。将混合的样品在室温条件下孵育2-5分钟，在2~8° C下以不超过12,000×g的离心力高速冷冻离心10分钟。RNA沉淀在离心前通常不可见，形成一胶状片状沉淀附着于试管壁和管底。

4. RNA 的漂洗

移去上层悬液。用75%的乙醇洗涤RNA沉淀一次，每1 ml的RNApure Reagent至少加1ml的75%乙醇。旋涡振荡混合样品并在2~8° C下以不超过7,500×g的离心力高速冷冻离心5分钟。

问题	评论与建议
A260/A280 比率<1.65	*在分光光度计测量前用水而不是用TE缓冲液稀释RNA样品。低离子强度和低pH溶液会增加280nm处的光吸收值。 *样品匀浆化时所加的RNApure Reagent量太少。 *匀浆化后样品没有在室温下放置5分钟。 *分离的水样层中污染有苯酚层。 *终RNA没有完全溶解。
RNA 降解	*从动物体取下的组织没有立即进行抽提或冰冻保存。 *用于抽提的样品，或抽提的RNA样品保存于 - 5~ - 20° C，而不是存放于 - 60~ - 70° C。 *细胞经胰酶消化而分散。 *水溶液或试管污染有RNA酶。 *用于琼脂糖凝胶电泳的福尔马林pH低于3.5。
DNA 污染	*样品匀浆化时所加的RNApure Reagent 量太少。 *用于抽提的样品含有有机溶媒（例如，乙醇，DMSO），强缓冲液，或碱性溶液。

5. RNA 的再溶解

在操作的最后，简单干燥RNA沉淀（空气干燥或真空干燥5~10分钟）不要在真空中离心干燥RNA。尤为重要，不能让RNA沉淀完全干燥那样会极大地降低它的可溶性。部分溶解的RNA样品其A260/280比值<1.6。用移液管尖分几次移取无RNA酶的水或0.5%SDS溶液来溶解RNA，并在室温下孵育2-5分钟后混匀。（当RNA以后要用于酶切反应时，避免使用SDS。）RNA还能被100%甲酰胺（除去离子）再溶解并保存在-70° C。

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
每 1ml 液体样品或每 1mg 组织或 1×10 ⁶ 培养细胞预期的 RNA 产量	*人和动物全血，15~20 μg
	*人淋巴细胞（约7×10 ⁷ 白细胞），60~70 μg
	*肝和脾，6~10 μg
	*肾，3~4 μg
	*骨骼肌和脑组织，1~1.5 μg
	*胎盘，1~4 μg
抽提得率低	*上皮细胞 (1×10 ⁶ cultured cells), 8~15 μg
	*纤维母细胞 (1×10 ⁶ cultured cells), 5~7 μg
	*样品均化或裂解不完全。
	*终 RNA 不完全再溶解。