



总 RNA 提取试剂盒

Total RNA Extraction Kit

产品货号： C06-01029

产品规格： 100ml

保存条件： 4℃避光密闭保存，保质期 12 个月。

产品简介：

总 RNA 提取试剂盒是基于 TriZol 原理制备的一种通用总 RNA 提取试剂，采用优化的裂解液配方，裂解能力强，具有广泛的样本适应性。该方法简便、快捷，适用于动植物细胞、组织、酵母细胞以及细菌的总 RNA 抽提。其原理是利用异硫氰酸胍/酚/氯仿法，快速裂解细胞，溶解细胞内含物，抑制核酸酶活性，从而有效防止 RNA 在提取过程中的降解。加入氯仿后，溶液分为水相和有机相。RNA 保留在上层水相中，分离后可用异丙醇沉淀回收。本产品提取的总 RNA 产量大、纯度高，无基因组 DNA 和蛋白质污染，可直接用于 RT-PCR、Northern blot、dot blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护实验和分子克隆等一系列操作。

注意事项：

1. 试剂中含有苯酚等有害物质，应在通风橱内操作并使用个人防护用品如实验服、手套、防护眼镜或面具等，防止皮肤接触和吸入。
2. 预防 RNase 污染：
 - 1) 采用无菌操作规程；经常更换新手套，防止样品由于皮肤携带的细菌、真菌而导致的 RNase 污染。
 - 2) 使用经 DEPC-ddH₂O 处理过的塑料容器和枪头，避免交叉污染。
 - 3) RNA 在提取液中不会被 RNase 降解。但后续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150℃烘烤 4 h，塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 min，然后用水彻底清洗后灭菌烘干使用。此外，使用 RNase 清除剂对实验器皿、实验仪器和工作台面进行处理，可有效去除 RNase，提高工作效率。
 - 4) 配制溶液应使用无 RNase 的水（制备方法：在去离子水中加入终浓度为 0.05% (v/v) 的 DEPC，充分混合，室温或 37℃放置过夜，高温高压灭菌）。
 - 5) 实验前需准备的试剂：RNA 实验专用的氯仿、异丙醇、75%乙醇（DEPC-ddH₂O 配制）、DEPC-ddH₂O 或 TE 缓冲液（DEPC-ddH₂O 配制）。
 - 6) 匀浆后加氯仿前，样品可在 -80℃放置一个月以上；溶解在 75%乙醇中的 RNA 可在 4℃保存一周或 -20℃保存一年。

操作流程：

1. 细胞裂解

组织样本：

提取液用量：每 50-100 mg 组织加 1 ml 提取液，样品体积不应超过提取液体积的 10%。

- 1) 将动物或植物组织切成小块，在液氮中磨碎或用匀浆器匀浆处理。
- 2) 将研磨好的组织粉末快速转入装有 1 ml 提取液的 2 ml 离心管中，在涡旋振荡器上迅速振荡混匀，

置于冰上，待所有的样品研磨完。

- 3) 裂解产物应呈澄清的透明粘稠液体。对于富含蛋白、脂肪或多糖物质的组织样品如肌肉、脂肪组织和植物结节部位等，匀浆后仍会存留有不溶物质，可于 4℃ 12,000 × g 离心 10 min，然后吸取上清至一新的离心管中。

细胞样本：

- 1) 贴壁细胞：吸尽培养液，每 10 cm² 培养面积（6 孔板单孔或 35 mm 平皿）加入 1 ml 提取液，用加样器吹打数次，以确保细胞完全裂解，然后转移至离心管中。

注：提取液的使用量应由培养皿表面积决定，而非由细胞数目决定。提取液量不足可能导致提取的 RNA 中有 DNA 污染。

- 2) 悬浮细胞：离心收集细胞，吸尽液体，每 5-10×10⁶ 动植物或酵母细胞，或每 1 × 10⁷ 细菌细胞加入 1 ml 提取液，用加样器吹打，使其完全裂解，然后转移至离心管中。

注：添加提取液前切勿洗涤细胞，以免 RNA 降解。必要时可以用匀浆器来裂解某些细菌或者酵母细胞。

2. 液相分离

- 1) 裂解产物于室温放置 5 min，使核酸-蛋白复合物完全分离。（注：此时样品可在 -80℃ 长期保存。）
- 2) 每 1 ml 提取液 加入 0.2 ml 氯仿，盖紧管盖，剧烈振荡 15 s，室温放置 2-3 min。
- 3) 4℃ 12,000 × g 离心 15 min，样品会分成三层：桔黄色的下层有机相，中间层和无色的上层水相。
- 4) 吸取含总 RNA 的上层水相至一新的离心管中，吸取水相的体积为所用提取液 试剂的 60%。

3. RNA 回收

- 1) 按照每 1 ml 提取液 的最初使用量加入 0.5 ml 异丙醇，颠倒数次混匀，室温放置 10 min。
- 2) 4℃ 12,000 × g 离心 10 min，弃除上清，可见胶状的 RNA 沉淀。
- 3) 按照每 1 ml 提取液 的最初使用量加入 1 ml 75%乙醇，颠倒数次混匀，洗涤沉淀。
- 4) 4℃ 12,000 × g 离心 5 min，弃除上清。
- 5) 室温倒置 5-10 min 晾干或真空抽干（不要使用真空干燥离心机，以免 RNA 过干，难以溶解）。
- 6) 加入适量（如 25 μl）DEPC-ddH₂O 或 TE 缓冲液，用加样器吹打数次溶解 RNA。
- 7) 通过 RNA 电泳以及紫外分光光度计检测，确定 RNA 的浓度、纯度和完整性。
- 8) 所得的 RNA 应立即使用或适量分装后 -80℃ 保存，避免反复冻融。

RNA 提取常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
产量低	样品裂解或匀浆处理不彻底	加入提取液后彻底匀浆，植物和酵母在液氮中充分研磨
	RNA 终产物溶解不完全	注意避免 RNA 过分干燥；对难溶的沉淀可于 50-60°C 加热 5min 助溶
RNA 降解	组织或细胞样品取出后没有马上处理或于 -80°C 冷冻	采用新鲜材料；不能及时提取 RNA 的样品应于 -80°C 或液氮冷冻保存
	提取的 RNA 长期保存置于 -20°C	应置于 -80°C 长期保存
	细胞在胰酶处理时被破坏	避免使用胰蛋白酶，直接使用提取液裂解细胞
	溶液或离心管未经 RNase 去除处理	氯仿抽提之后的所有步骤都需采用无 RNase 的试剂和容器
	电泳时使用的甲酰胺 pH 值低于 3.5	正确配制 RNA 变性凝胶
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ < 1.65	检测吸光度时，RNA 样品溶于水中	使用 TE 稀释 RNA 样品进行检测
	样品匀浆时的提取液用量过少	通常向每 50 mg 组织、每 10 cm ² 培养面积、或每 5-10×10 ⁶ 细胞中加入 1 ml 提取液；每 0.25 ml 体液样品中加入 0.75 ml 提取液 LS
	匀浆后样品未在室温放置 5 min	匀浆后室温放置 5 min
	苯酚污染（270 nm 强吸收峰）	4°C 下离心；小心吸取上层水相，避免混有有机相；对污染的样品使用乙醇沉淀去除苯酚
	最后得到的 RNA 沉淀未完全溶解	避免使用真空干燥离心机干燥 RNA 沉淀；对难溶的沉淀可于 50-60°C 加热 5 min 助溶
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ > 2.0	RNA 降解使 OD ₂₆₀ 值升高	尽可能采取一切避免 RNA 降解的措施
DNA 污染	样品匀浆时的提取液用量过少	通常向每 50 mg 组织、每 10 cm ² 培养面积、或每 5-10×10 ⁶ 细胞中加入 1 ml 提取液；每 0.25 ml 体液样品中加入 0.75 ml 提取液 LS
	起始样品中含有溶剂（如乙醇，DMSO 等）、强缓冲液或碱性溶液	使用 DNase I 处理 RNA 溶液