

## 组织细胞 RNA 提取试剂盒(异硫氰酸胍提取法)

### 产品简介:

RNA 的种类来源比较多, 提取制备的方法各异, 一般有苯酚法、去污剂法和盐酸胍法, 其中最常用的是苯酚法, 即 Trizol 法提取 RNA, 异硫氰酸胍作为强的阴离子表面活性剂, 可以有效的解离核蛋白与核酸的复合体, 并对 RNase 产生强烈的抑制作用, 保持 RNA 的完整性, 加入氯仿等试剂并离心, 上层清液用异丙醇沉淀回收总 RNA。

Leagene 组织细胞 RNA 提取试剂盒(异硫氰酸胍提取法)适用于从各种组织或细胞中快速分离总 RNA, 既可用于小量样品(50 ~ 100 mg 组织、 $5 \times 10^6$  细胞), 也可用于大量样品(>1g 组织、 $>10^7$  细胞), 提取的总 RNA 质量高, 可用于 Northern Blot、Dot Blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆, 该试剂盒具有以下特点: ①适用范围广; ②操作简单, 整个过程 90min 内完成; ③纯度高; ④污染少。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成:

名称	编号	NE0262	Storage
		50T	
试剂(A): RNA 提取液		30ml	RT 避光
试剂(B): 乙酸钠缓冲液		3ml	RT
试剂(C): RNA 分离液		30ml	RT 避光
试剂(D): RNA 沉淀液		30ml	RT
试剂(E): RNA 洗涤液		50ml	RT
试剂(F): RNase-free ddH <sub>2</sub> O		10ml	RT
试剂(G): RNA 保存液		10ml	RT 避光
使用说明书		1 份	

### 自备材料:

- 1、液氮、研钵或匀浆器、低温高速离心机、低温冰箱
- 2、经 RNase free 处理的移液器吸头、EP 管等耗材
- 3、无菌 PBS 缓冲液

### 操作步骤(仅供参考):

- 1、实验准备: RNA 分离液室温放置 15min 确保两相分开, 无菌 PBS 缓冲液、RNA 提取液和 RNA 沉淀液冰上预冷。

## 2、样品准备

1)贴壁细胞：①直接裂解：直接在培养瓶/皿中加入 RNA 提取液裂解细胞，每 10cm<sup>2</sup> 面积加 1ml，用移液器吹打混匀。②胰蛋白酶消化：用无菌 PBS 洗涤细胞后，加入含有 0.05 ~ 0.25%胰蛋白酶的 PBS 处理细胞，当细胞脱离容器壁后，加入含有血清的培养基终止反应，将细胞溶液转移至无 RNase 的离心管中，以下参考悬浮细胞相关操作步骤。

2)悬浮细胞：收集(1~5)×10<sup>6</sup> ~ 10<sup>7</sup> 动物、植物和酵母细胞或 10<sup>7</sup> 细菌细胞加至 1.5ml 离心管，5000 ~ 6000g 离心 5min，用无菌 PBS 重悬细胞沉淀，再次 5000 ~ 6000g 离心 5min 收集细胞沉淀，去除上清，收集细胞时一定要将溶液去除干净，否则裂解不完全，降低 RNA 收获率，向沉淀中加入加入 0.5ml RNA 提取液，充分振荡混匀。

3)组织：取新鲜动物或者植物组织或者 -70℃冻存组织，50 ~ 100mg 组织在液氮中充分研磨或者加入 0.5ml RNA 提取液研磨或者用匀浆器匀浆处理，样品体积一般不超过提取液体积的 10%，研磨要迅速，以 1min 为佳。

4)血液：取 0.5 ~ 1 ml 新鲜或冻存的血液，12000g 离心 5 min，去除血浆，加入 0.5ml RNA 提取液，充分振荡混匀。

3、核酸分离：将细胞液或匀浆液转移至 1.5ml 离心管，加入 1/10 体积的乙酸钠缓冲液，颠倒混匀 5~6 次，加入等体积 RNA 分离液，颠倒混匀 5~6 次后震荡 10-20s，冰上放置 15min，使核蛋白与核酸完全分离。

4、样品分层：12000 g 4℃离心 10 ~ 15 min，RNA 在上层水相。

5、沉淀 RNA：吸取上层水相(约 0.5ml)转移至新的 1.5ml 离心管中(不要吸取任何中间层物质,否则会有染色体 DNA 污染)，加入等体积 RNA 沉淀液混匀，冰上放置 10 ~ 15 min，12000 g 4℃离心 10 min，离心后管侧或管底形成胶状沉淀，弃上清。

6、洗涤 RNA：加入 1ml RNA 洗涤液轻轻洗涤沉淀，冰上放置 5 ~ 10 min，7500g 4℃离心 5 min，弃上清，室温干燥 10 ~ 30 min，不宜过分干燥，否则 RNA 难以溶解。

7、溶解 RNA：加入 30 ~ 50ul RNase-free ddH<sub>2</sub>O 充分溶解，-70℃长期保存或直接用于后续试验，对于肝、胰腺、肾等组织中 RNase 含量高的样品沉淀用 RNA 保存液溶解。

## 注意事项：

1、样品保存：加入 RNA 提取液混匀后样品可在 -70℃放置 1 月；RNA 样品可以在 70%酒精中 -70℃保存 2 ~ 4 周；如果需要长期保存，应置于超低温冰箱中保存。

2、RNA 提取液和 RNA 分离液含有腐蚀性物质，污染皮肤或眼睛后，立即用清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医生的帮助。

3、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

4、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

**有效期：**12 个月有效。

**分析与定量:**

- 1、测定样品在 260 nm 和 280 nm 的吸收值确定 RNA 的质量, 按  $1OD=40\mu\text{g RNA}$  计算 RNA 的产率,  $OD_{260}/OD_{280}$  在 1.8 ~ 2.0 视为抽提 RNA 纯度较好, 浓度在  $4\mu\text{g/ml}$  以上的样品适于用分光光度计测定。
- 2、进行甲醛变性琼脂糖电泳, 确定 RNA 的完整性和污染情况。
- 3、核酸分析仪测定 RNA 的质量和纯度。

**常见问题分析:**

常见问题	可能原因
<b><math>A_{260}/A_{280} &lt; 1.6</math></b>	抽提得到的 RNA 沉淀未完全溶解。
	水相中混有有机相, 从而存在蛋白质和 DNA 污染。
	RNA 样品用水而不是 TE 溶解。低离子浓度和低 pH 条件下, $A_{280}$ 值会偏高。
	样品匀浆时加的 RNA 提取液太少, RNA 与蛋白质、DNA 未能完全分离。
	匀浆后样品未在室温放置或者放置时间太短, RNA 与核蛋白未完全解离。
<b>DNA 污染</b>	样品中含组织溶剂(如乙醇等)或碱性溶液, 致水相减少或 pH 升高。
	样品匀浆时加入的试剂体积太少。如果存在 DNA 污染, 可用 DNA 清除剂去除。
	水相中混有有机相, 从而存在蛋白质和 DNA 污染。
<b>RNA 产量低</b>	样品裂解或匀浆处理不彻底, RNA 没有被完全释放出来。
	得到的 RNA 沉淀未完全溶解。
	抽提的 RNA 中含有 RNase。
<b>RNA 降解</b>	组织或细胞不新鲜, 样品没有及时被液氮冻存, 导致组织或细胞中的 RNA 降解。
	溶液或离心管未经 RNase free 处理, RNase 的污染导致 RNA 被降解。
	细胞在胰蛋白酶消化时间过长, 导致未加 RNA 提取液前 RNA 已经部分降解。
	电泳时使用的甲酰胺 pH 小于 3.5, 导致 RNA 发生酸解。
<b>蛋白和多糖污染</b>	水相中混有有机相, 从而带有蛋白质和 DNA。
	样品中蛋白、多糖含量高或样品量太大, 细胞未裂解完全。

**相关产品:**

产品编号	产品名称
IH0305	柠檬酸钠抗原修复液(50×)
IH0340	免疫染色一抗稀释液
PE0103	Acr-Bis(30%,29:1)
PW0082	丽春红 S 染色液(1×Ponceau S)
TC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)