

**AipPure 组织/细胞总 RNA 快速提取试剂盒, TRIzol 法(离心柱型)**  
AipPure Tissue/Cell Total RNA Rapid Extraction Kit, TRIzol(Centrifugal Column)

**使用说明书**

◆目录号: RE203

◆试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次(RE203-01)
裂解液 RL	4°C(避光)	50mL
去蛋白液 RE	室温	25mL
漂洗液 RW	室温	10mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
吸附柱 RA 和 2mL 收集管 (RNase-free)	室温	50 套

◆储存条件: 本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

◆储存事项:

1. 因此运输和储存均在室温下(15°C-25°C)进行。裂解液 RL 可以常温运输, 收到后 4°C 避光可长期保存, 常温保存 3 个月也不影响使用质量。
2. 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: 改进的异硫氰酸胍/酚一步法(TRIzol 法)裂解细胞和灭活 RNA 酶, 然后总 RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase-free Water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

◆产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好, 纯度高和离心柱方便快捷的优点, 不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程, RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的裂解液 RL 配方, 可以有效的消除基因组污染。

4. 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
5. 有效的去除了 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。

◆**注意事项：**

1. 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
2. 本试剂盒抑制 RNA 酶效果极佳，所有离心步骤如未加说明，均可在常温进行。
3. 裂解液 RL 和去蛋白液 RE 中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
4. 考虑到环保问题，本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，使用前需要自备氯仿。
5. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析 RNA 的质量。好的 RNA 产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体 RNA 带，分别为~5kb(28S)，~2kb(18S)，条带亮度比值约为 2: 1。有时候也可以看到~0.1kb 和 0.3kb(5S, tRNA) 带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到 4, 5 条带也属于正常现象，如果 RNA 未成熟的前体或者不均一核 RNA、小核 RNA 提取出来也可能看到介于 7Kb 和 15Kb 之间的不连续的高分子量条带。
6. 检测 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 吸光度比值时，如需稀释 RNA 样品应该用 TE(PH 8)，如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和 PH 值低，会使 OD<sub>280</sub> 升高，从而使比值降低。
7. 加入裂解液 RL 匀浆后，加氯仿前，样品可在 -60°C-70°C 保存一个月以上。
8. 若提取细菌 RNA，推荐 EASYspin 系列细菌 RNA 提取试剂盒(目录号：RE260 和 RE261)。

◆**操作步骤(实验前请先阅读注意事项)：**

**提示：**第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入指定量无水乙醇！

1. 匀浆处理
  - a) **组织：**将组织在液氮中磨碎，每50~100mg组织加1mL的裂解液RL后匀浆。组织样品容积不能超过裂解液RL容积的10%。
  - b) **单层生长的细胞：**直接往直径3.5 cm的培养板中加入1mL的裂解液RL溶解细胞，并用移液枪轻轻吹打混匀。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的裂解液RL量(每10cm<sup>2</sup>加1mL)。一般情况下，普通大小的细胞培养瓶，加入1mL的裂解液RL，迅速轻摇使裂解液RL充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活RNA酶，轻轻用移液枪反复吹打混匀。当裂解液RL量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。
  - c) **悬浮生长的细胞：**通过离心来沉淀细胞，小心弃上清。每5~10×10<sup>6</sup>的动物细胞，植物细胞加1mL的裂解液RL。在裂解液RL试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。

在加入裂解液RL前应避免洗涤细胞，否则会增加mRNA降解的可能性。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀，在15 -30°C条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。
3. **可选步骤**：4°C的条件下12,000rpm 离心10分钟，小心取上清转入一个新的RNase-free的离心管中。当样品富含蛋白质、脂肪、多糖或是细胞外物质例如肌肉、脂肪组织或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12,000rpm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。
4. 每1mL 裂解液RL加0.2mL氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡15秒并将其在室温下孵育3分钟。
5. 于4°C 12,000rpm 离心10分钟，样品会分成三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相，RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加裂解液RL体积的50%，把水相小心转移到新管中(不要触碰中间层)，记录水相体积。
6. 加入水相体积一半也就是0.5倍体积的无水乙醇，混匀(此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱RA中(吸附柱套在收集管内，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱RA中，请分两次转入吸附柱RA中。) ，12,000rpm 离心45秒，弃废液，将吸附柱重新套回收集管。
7. 加500μL去蛋白液RE，12,000 rpm离心45秒，弃废液。
8. 加入500μL漂洗液RW(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 rpm 离心45秒，弃废液。
9. 重复步骤8一次。
10. 将吸附柱RA放回空收集管中，13,000 rpm离心2分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 取出吸附柱RA，放入一个RNase-free离心管中，根据预期RNA产量在吸附膜的中间部位加50-80μL RNase-free Water，室温放置2分钟，12,000 rpm 离心1分钟。如果需要较多RNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心1分钟，或者另外再加30μL RNase-free Water，离心1分钟，合并两次洗脱液。

**注** 洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要RNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于30μL，体积小降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。

=====



扫码关注我们