

## TRNpure Reagent TRNpure 总 RNA 提取试剂

目录号: RNE01

### 制品内容

|                  |        |
|------------------|--------|
| TRNpure Reagent* | 100 ml |
|------------------|--------|

\*本产品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会引起中毒、灼伤及其他身体伤害，使用时应穿戴防护物，如防护服、手套、眼罩、面罩等。如果不小心接触到眼睛时，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。

### 保存方法

常温运输，2-8℃避光保存两年。

### 产品介绍

TRNpure Reagent 是一种用于各种动植物组织、细菌、细胞、全血、病毒液总 RNA 抽提试剂，具有极强的裂解能力，可在短时间内裂解细胞和组织样本，并有效抑制样本中 RNA 的降解，保持 RNA 的完整性。样品在该试剂中能够充分裂解，之后加入氯仿离心分层，形成上清层、中间层和有机层(红色下层)，RNA 分布在上层水相中，收集上清层后，经异丙醇沉淀便可得到总 RNA。提取的总 RNA 纯度高，基本不含蛋白质及基因组 DNA，可直接用于 Northern、点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RT-PCR、poly(A)+选择、RNA 酶保护分析以及构建 cDNA 文库等多种分子生物学实验。

此外，样品中的 DNA 和蛋白也能以沉淀的方式还原。乙醇沉淀能析出中间层的 DNA，而在有机层中加入异丙醇能沉淀出蛋白。

TRNpure 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锭染色，可见许多介于 7 kb 和 15 kb 之间不连续的高分子量条带 (mRNA 和 hnRNA 成分)，两条优势核糖体约 5 kb (28S) 和约 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 $\geq 1.8$ 。

### 注意事项

1. 需自备氯仿、异丙醇、75%乙醇、RNase-free H<sub>2</sub>O。
2. 样品用 TRNpure Reagent 匀浆后，在加入氯仿前，可在 -70℃冻存一个月以上 (注意正确操作是样品充分裂解之后再冻存)。
3. RNA 沉淀在 75%乙醇中，4℃可保存 1 周，-20℃可保存 1 年。

## 标准抽提步骤

1. 样品匀浆
    - a) **动物或植物组织/植物细胞/酵母/细菌**：将样本在液氮中充分研磨，每 30-100 mg 组织中加入 **1 ml TRNpure Reagent** 匀浆。
    - b) **单层培养细胞**：向直径 3.5 cm 的培养板/瓶中加入 **1 ml TRNpure Reagent**（按培养板面积而不是细胞数决定加入量，每 10 cm<sup>2</sup> 加入 1 ml），用移液器轻轻反复吸打裂解细胞至溶液透明。
    - c) **细胞悬液**：离心取细胞，弃上清，每 5-10×10<sup>6</sup> 动物/植物/酵母细胞或每 10<sup>7</sup> 细菌细胞加入 **1 ml TRNpure Reagent** 混匀裂解细胞。加入 TRNpure Reagent 前不要洗涤细胞，以免降解 mRNA。一些酵母和细菌可能需要匀浆仪或液氮研磨破壁处理。
    - d) **血液与病毒液处理**：直接取新鲜的血液或病毒液，加入 3 倍体积 **TRNpure Reagent**（推荐 0.25 ml 全血或病毒液加入 **0.75 ml TRNpure Reagent** 试剂），充分振荡混匀。
  2. 将匀浆样品在室温（15-30℃）放置 5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。
  3. **可选步骤**：4℃，12,000 rpm(~13,400×g)离心 5 min，转移上清到新的离心管中。  
**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，可离心除去。离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量的 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. 加入 **200 μl 氯仿**，盖好管盖，剧烈振荡 15 s，室温放置 3 min。
  5. **4℃，12,000 rpm 离心 10 min**。匀浆会分为三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相。RNA 存在于水相中。水相层的体积大约为所加 TRNpure Reagent 体积的 50%，把水相转移到新的离心管中。
  6. 在得到的水相溶液中加入**等体积异丙醇**，颠倒混匀，室温放置 10 min。
  7. **4℃，12,000 rpm 离心 10 min**，弃上清，一般在离心后在离心管底部会出现 RNA 沉淀。
  8. 加入 75%乙醇（用 RNase-free 水配制）洗涤沉淀。每使用 1 ml TRNpure Reagent 用 1 ml 75%乙醇对沉淀进行洗涤。
  9. **4℃ 12,000 rpm 离心 3 min**，小心倒出液体，注意不要倒出 RNA 沉淀，剩余的少量液体短暂离心后用 200 μl 吸头吸出，注意不要吸弃沉淀。
  10. 打开离心管盖，室温放置晾干（晾干 2-3 min 左右即可，不要晾的过干，RNA 完全干燥后很难溶解）。根据实验需要，加入 **30-100 μl RNase-free H<sub>2</sub>O**，反复吸打、混匀，充分溶解 RNA，得到的 RNA 保存在-70℃，防止降解。
-