

TRNpure Total RNA Kit
TRNpure 高纯总 RNA 提取试剂盒目录号: **RNE03****试剂盒组成**

Component	RNE03 (50 preps)
Buffer RZ	50 ml
RNA Extraction Agent	6 ml
Buffer RW1	25 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml
RNase-free H ₂ O	10 ml
Spin Columns RA with Collection Tubes	50

保存方法

Buffer RZ 常温运输, 4°C 避光保存 (室温存放 3 个月无影响), 其它组分 RT (15-30°C)。

产品介绍

改进的异硫氰酸胍/酚一步法迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 用乙醇调节结合条件后, 总 RNA 选择性吸附于离心柱内硅基质膜上, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤将细胞代谢物, 蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。提取的 RNA 纯度高, 质量稳定可靠, 可直接应用于下游 RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot 和体外翻译等实验。

实验前准备及重要注意事项

1. 需自备无水乙醇。
2. 氯仿是易制毒危险品, 是国家管制化学品, 试剂盒提供的 RNA Extraction Agent 可以代替氯仿的分层作用, 其使用量是氯仿的一半 (详见操作步骤 3)。
3. 提取的样品避免反复冻融, 否则影响 RNA 提取得率和质量。
4. 第一次使用 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。
5. 样品加入 Buffer RZ 匀浆后, 加氯仿前, 可在-70°C 保存一个月以上 (注意正确操作是样品充分裂解之后再冻存)。

操作步骤

1. 样本处理

a) **动物/植物组织**：将组织在液氮中充分研磨，每 50-100 mg 组织中加入 **1 ml Buffer RZ** 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 Buffer RZ**（按培养板面积而不是细胞数决定加入量，每 10 cm² 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 5-10×10⁶ 动物/植物/酵母细胞或每 10⁷ 细菌细胞加入 **1 ml Buffer RZ** 混匀裂解细胞。加入 Buffer RZ 前不要洗涤细胞，以免降解 mRNA。一些酵母和细菌细胞可能需要匀浆仪处理。

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°C）放置 5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

3. 加入 **100 µl RNA Extraction Agent**（或 **200 µl 氯仿**），盖好管盖，用手剧烈振荡 15 s，室温放置 3 min。

4. 4°C，12,000 rpm 离心 10 min，转移上清（约 **400-500 µl**，无需全部吸取，以免碰触中间层）到新的离心管中。

5. 加入 **0.5 倍上清体积的无水乙醇**，颠倒混匀（可能会出现沉淀，不影响后续操作），将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RA）中，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

6. 向吸附柱 RA 中加入 **500 µl Buffer RW1**，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

7. 向吸附柱 RA 中加入 **600 µl Buffer RW2**（使用前检查是否加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

8. 重复步骤 7。

9. 将吸附柱放回空收集管内，12,000 rpm 离心 2 min。

注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

10. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 **30-100 µl RNase-Free H₂O**，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液，-70°C 保存。
注意：RNase-Free H₂O 体积不应少于 30 µl，体积过小影响回收效率。
