

# AipPure 总 RNA 提取试剂

## AipPure Total RNA Extraction Reagent

### 使用说明书

#### ◆货号及规格:

目录编号	包装规格
RE100-01	100mL

◆**适用范围:** 适合动物组织、植物材料、细胞、病毒、液体样本、微生物等样本。

◆**产品储存:** 常温运输, 4℃避光保存, 室温保存 12 个月, 4℃保存 24 个月。

#### ◆产品介绍:

本制品是基于异硫氰酸胍和酚, 具有极强的裂解能力, 可在短时间内裂解细胞和组织样本, 保证RNA的完整性。本产品广泛适用于培养细胞、动物组织、微生物, 以及次生代谢较少的植物组织, 如幼苗、幼叶等。样品在本制品中能够充分被裂解, 在加入氯仿离心后, 溶液会形成上清层、中间层和有机层(鲜红色下层), RNA分布在上层水相中, 收集上清层后, 经异丙醇沉淀便可以回收得到Total RNA。

本制品是广谱型总RNA提取试剂, 实验操作快速方便, 颜色鲜明, 便于分层。本试剂适用范围广泛, 可以从动物组织、植物材料、细胞、病毒、微生物等样品中提取总RNA。该方法对少量的组织(50-100mg)和细胞( $5 \times 10^6$ )以及大量的组织( $\geq 1g$ )和细胞( $> 10^7$ )均有较好的分离效果。

本制品提取的总RNA完整性好, 基本无蛋白和DNA污染, 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进行琼脂糖凝胶电泳(注: 如果是普通琼脂糖凝胶电泳, 28S的位置大约在2kb, 18S大约在1kb的位置, 不同浓度的凝胶位置变化较大), 并用溴化乙啶染色, 可见许多介于7kb和15kb之间不连续的高分子量条带(mRNA和hnRNA成分), 两条优势核糖体~5 kb(28S)和~2 kb(18S), 低分子量RNA介于0.1 kb和0.3 kb之间(tRNA, 5S)。当抽提的RNA用TE稀释时其A260/A280比值能达到1.8以上, 提取的RNA纯度高完整性好, 可用于下游各种分子生物学常规实验, 如RT-PCR、qRT-PCR、Northern-Blot、Dot-Blot、体外翻译等。

#### ◆注意事项:

1. 本制品中含有苯酚, 具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会导致中毒、灼伤以及其他身体伤害。使用本制品时应穿戴防护用品(如防护服装、手套、

眼罩、面罩等)。如不慎接触,应立即用大量的清水冲洗,严重的请立即前往医院治疗。

2. 样品用本制品匀浆后,如果不即刻加入氯仿之前,置于-70°C下可放置一个月以上。保存在75%乙醇中的RNA沉淀,2-8°C可以保存一周,-20°C条件下可以保存1年。RNA半衰期比较短,容易降解,建议提取后尽快进行后续实验。
3. 若下游实验对DNA非常敏感,建议用DNase I(RNase-free)(货号: M328)对RNA进行纯化处理。
4. 自备试剂耗材: 氯仿、异丙醇(新开封或提取RNA专用)、75%乙醇(用DEPC处理过的水配制)、RNase-free Water或DEPC水、RNase-free的实验器具和耗材等。

◆操作步骤(实验前请先阅读注意事项):

**提示:** 用本制品抽提RNA时须在化学通风橱完成操作,要戴手套和护眼罩,避免接触皮肤和衣服,避免呼吸道吸入。如无特殊说明,所有的操作应该在在15~30°C的室温条件下进行操作即可。

1. 样本处理

<b>动物组织:</b>	取新鲜或-70°C冻存动物组织尽量剪碎,每30-100mg组织加入1mL提取试剂,匀浆仪进行匀浆处理。或在液氮中研磨后加入1mL提取试剂,混匀。 <b>注意:</b> 样品体积一般不要超过提取试剂体积的10%。
<b>植物组织:</b>	取新鲜植物组织在液氮中充分研磨或将植物组织剪碎后,直接在提取试剂中迅速研磨,每50-100mg组织加入1mL提取试剂,混匀。 <b>注意:</b> 样品体积一般不要超过提取试剂体积的10%。
<b>贴壁细胞:</b>	尽量去除干净残留培养液后,直接往直径3.5cm的培养板中加入1mL的提取试剂覆盖并反复吹打裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的提取试剂的量(每10cm <sup>2</sup> 加1mL)。当提取试剂的量不足时可导致抽提的RNA中含有污染的DNA。 <b>注意:</b> 贴壁培养细胞往往不能完全从培养瓶(皿)脱落,这并不意味着裂解不完全,此时细胞膜实际已经完全破裂开,并已释放出全部RNA,继续做即可。
<b>悬浮细胞:</b>	离心收集细胞,在加入提取试剂后,反复吹打来裂解细胞。每5~10×10 <sup>6</sup> 的动物细胞,植物或酵母菌细胞或每1×10 <sup>7</sup> 细菌加1mL的提取试剂。在加入提取试剂前应避免洗涤细胞,因为那样会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。
<b>液体样本:</b>	每200μL(低于200μL时,可用RNase-free Water补足)血浆、血清等液体样本,加入1mL提取试剂后,振荡混匀。 <b>注:</b> 提取液体样本时,推荐使用本公司的Aipure TRIzol LS Reagent(货号: RE202),这是全血或者液体样品专用的TRIzol试剂,LS就是Liquid Sample液体样品的首字母缩写,相当于Invitrogen公司液体样本提取专用的TRIzol LS试剂。

2. 将匀浆样品剧烈震荡后在室温条件下放置5分钟以使核蛋白体完全解离。

3. **可选步骤：**在 4°C 的条件下以 12,000 rpm 的离心力离心 10 分钟，取上清。

**注：**如样品中含有较多蛋白质、脂肪、多糖或肌肉、植物的块茎结节等可离心去除。离心后的沉淀中包含有细胞外膜、多糖以及高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织的样品时，上层是大量油脂应除去。取澄清的匀浆液进行下一步。

4. 每 1mL 提取试剂加 0.2mL 氯仿。盖紧管盖，剧烈震荡 15 秒并将其在室温下放置 2~3 分钟。

5. 在 4°C 12,000 rpm 的离心机上高速冷冻离心 10-15 分钟。离心后混合物分成三层：下层红色有机苯酚氯仿层，中间层，上层无色的水样层。RNA 无一例外的存在于水样层当中。水样层的容量大约为所加提取试剂容量的 50-60%左右。

**注：**下层红色有机层和中间层是蛋白和 DNA，如果需要提取，请联系我们索取提取方法。

6. 将水样层转移到一干净的离心管中，加入等体积异丙醇，颠倒混匀后室温放置 10 分钟。

**注：**RNA 沉淀在离心前通常不可见，离心后在管侧和管底形成胶状沉淀。

7. 在室温或者 4°C 12,000 rpm 离心 10 分钟，弃上清。

8. 加入 75%乙醇洗涤沉淀。每使用 1mL 的提取试剂用 1mL 的 75%乙醇对沉淀进行洗涤。

9. 在室温或者 4°C 用 12,000 rpm 离心 3 分钟，弃上清(注意不要丢失 RNA 沉淀)。

**注：**剩余的少量液体可短暂离心，然后用枪头吸出，注意不要吸弃沉淀。

10. 室温放置 2-3 分钟，晾干。加入 30-100µL RNase-free Water，充分溶解 RNA，得到的 RNA 保存在 -70°C，防止降解。

**注：**沉淀不要过分干燥，以免难于溶解。

◆常见问题：

问题描述	解决方案
RNA 发生降解。	<p>1. 确保提取 RNA 的试剂和器具没有被 RNase 污染，所有离心管、枪头及相关溶液都必须无 RNase 污染，耐高温器物可于 150°C 烘烤 4 - 6h 以去除 RNase，其它器物可用 0.1%的 DEPC 水浸泡过夜。做好防护工作，戴口罩和一次性干净手套，并在单独的洁净区操作。</p> <p>2. 细胞或组织样品需立即加入本制品，并迅速进行匀浆裂解。若处理不当，发生细胞或组织冻融，RNase 会被释放出来降解 RNA。针对内源 RNase 含量高或不易匀浆的组织，需将组织切成小块后立即投入液氮冷冻，</p>

	<p>然后进行研磨，在整个研磨过程中，样品不得融化。</p> <p>3. 提取的 RNA 样品需要妥善保存, 建议取少量进行检测, 其余样品分装于-85 ~ -65℃保存。进行电泳检测可以提高电压并缩短跑胶时间, 同时对电泳缓冲液进行冰浴降温, 防止跑胶过程中 RNA 发生降解。</p>
<p>组织样本应该如何保存?</p>	<p>如果不能立刻提取RNA, 应将组织离体后迅速投入液氮冷冻, 并用液氮保存; 或液氮速冻后, 转移至-85 ~ -65℃保存。不能直接将新鲜组织放在-85 ~ -65℃冷冻, 因为样品的冻结是一个缓慢的过程, 在这个过程中内源 RNase会将RNA降解。此外, 针对不具备液氮速冻条件的情况, 可将新鲜组织充分浸泡在AipSave 无液氮RNA 样品储存液(货号: NS101)中, 室温可存放一周, 2 ~ 8℃存放一个月, -30 ~ -15℃(或-85 ~ -65℃)长期保存。</p>
<p>提取的 RNA 有基因组污染。</p>	<p>向裂解液中加入氯仿后, 需要在低温下(2 ~ 8℃)高速离心。离心后, RNA被抽提到上层的水相中, 下层是有机相, 含有氯仿, DNA即存在于中层。氯仿在常温下会与水以一定的比例互溶, 因此, 常温离心会导致上层水相中也有少量基因组DNA污染。因此吸取上层液时, 应非常小心, 避免吸到中间层和下层, 为此牺牲一点得率, 保留一些上清不吸。</p>
<p>加入异丙醇离心后看不见沉淀。</p>	<p>通常情况下, 经过异丙醇沉淀可以看见白色沉淀。若遇到沉淀不可见的情况, 可能是RNA含量低或者组织投入量过低。</p>
<p>RNA 应该如何保存?</p>	<p>提取的 RNA 产物可以分装后在-85 ~ -65℃长期保存, 在-30 ~ -15℃仅可短期保存。</p>

=====



扫码关注我们