

# 操作手册

## 总 RNA 提取试剂盒(配合 TRIZOL 使用)

Catalog No. TR205-50	(50 次反应含 DNaseI)
TR205-200	(200 次反应含 DNaseI)
TR205-50N	(50 次反应无 DNaseI)
TR205-200N	(200 次反应无 DNaseI)

### Highlights

- 适用于从细胞，组织，酵母菌，植物，细菌或生物液体（任何 TRIZOL 或类似产品可以裂解的样品）中提取到总 RNA（含 microRNA）。
- 无需进行相分离，无需使用氯仿，无需沉淀过程。
- 提取到的 RNA 不含 DNA,并可应用于 Q-PCR，高通量测序等实验。
- 整个过程仅需 10 分钟。

## 产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次	200 次
RNA 洗涤液 1	室温	40 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	160 ml
RNA 洗涤液 2	室温	12 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	48 ml
DNase I	-20℃	300µl x 1 管 (5U/µl)	300µl x 4 管 (5U/µl)
DNA 消化液	室温	4 ml	16 ml
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	6 ml	30 ml
2 号柱	室温	50 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	200 个

## 特性:

1. 样品来源: TRIZOL等类似试剂裂解的样品。
2. 样品范围: ≥17核苷酸。
3. RNA纯度: 高质量的RNA可应用于高通量测序等敏感的下游实验。
4. RNA结合量: 每个柱子可最多结合50µg的RNA。

## 试剂制备

**RNA 洗涤液** 在使用之前一定要配好, 添加好乙醇后在试剂瓶上做好标记!!!

添加 10ml 或 40ml 的无水乙醇 (95-100%) 到 40ml 或 160ml 的 **RNA 洗涤液 1** 中。

添加 48ml 100% 的乙醇 (或 52 ml 95% 的乙醇) 到 12ml 的 **RNA 洗涤液 2**

添加 192ml 100% 的乙醇 (或 208 ml 95% 的乙醇) 到 48ml 的 **RNA 洗涤液 2**

## **操作步骤:**

整个操作步骤是由2个步骤组成：(I) 样品裂解匀浆 (II) 样品纯化

### (I) 样品裂解匀浆

此步骤主要参考TRIZOL等类似裂解试剂说明书的裂解液用量，以下给出我公司提供的可完美替换TRIZOL的TRIcom试剂用量作为参考。

#### **a.组织**

动物组织：每30~50mg组织加1ml的TRIcom。裂解之后需要离心去除不溶的组织，然后将上清移置到一个RNase-free的离心管内进行下面的样品纯化步骤。

植物组织：每50~100mg组织加1ml的TRIcom。裂解之后需要离心去除不溶的组织，然后将上清移置到一个RNase-free的离心管内进行下面的样品纯化步骤。

#### **b.单层生长的细胞**

单层贴壁细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 $1 \times 10^7$ ）：可直接在培养容器中裂解（容器体积不超过 $10 \text{ cm}^2$ ），或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀。（在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法）。

1) 直接裂解法：直接在培养板中加入RNApure裂解细胞，每 $10 \text{ cm}^2$  面积加入1 ml TRIcom。用 取样器吹打几次。 2) 胰蛋白酶处理法：确定细胞数量，吸除培养基，用PBS洗涤细胞，吸除PBS，向细胞中加入含有0.1-0.25%胰蛋白酶的PBS 处理细胞，当细胞脱离容器壁时，加入含有血清的培养基失活胰 蛋白酶，将细胞溶液转移至RNase-free 的离心管中， $300 \times g$  离心5 分钟，收集细胞沉淀，仔 细吸除所有上清。去除液体培养基后，直接往培养板中加入RNA裂解液溶解细胞，并用移液枪轻轻吹打混匀。依据细胞的数量来决定所需的RNA裂解液量（ $10^5$  细胞以内加100ul,  $10^6$  细胞加300ul）。

#### **c.悬浮生长的细胞**

离心沉淀细胞( $\leq 500 \times g$ )，完全去除上清后用RNA裂解液重悬细胞沉淀。可短暂涡旋振荡。

**d. 细胞悬液：**离心取细胞。每  $5 \times 10^6 - 10^7$  动物、植物和酵母细胞或每  $10^7$  细菌细胞加入 1 ml TRIcom。加入 TRIcom 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。

**e. 血液处理:** 直接取新鲜的血液, 加入3 倍体积**TRIcom** (推荐0.25ml 全血加入0.75ml **TRIcom**), 充分振荡并且混匀。

(II) 样品纯化: 以下离心力均在10,000-16,000 x g范围内进行。

1. 加入等体积(95-100%)的无水乙醇到上一步**TRIcom**或**TRIZOL**裂解液中混匀。
2. 将上述混合物放入套在收集管内的2号柱里, 离心1分钟。去除滤出液。
3. 柱上**DNase I**消化处理 (推荐) 此步骤主要是为了去除痕量的DNA。
  - a) 添加400µl的RNA洗涤液2到2号柱里, 离心1分钟。去除滤出液。
  - b) 对于每一次的样品处理需要制备80µl的**DNase I**反应液。配比为 **DNase I** 5µl **DNA消化液** 75µl
  - b) 直接添加混匀的80µl**DNase I**反应液到1号柱上, 在室温下 (20-30℃) 孵育15分钟。
4. 添加400µl的RNA洗涤液1到2号柱子里, 离心1分钟。去除滤出液。
5. 添加700µl的RNA洗涤液2到2号柱子里, 离心1分钟。去除滤出液。
6. 空转2分钟以去除残留的乙醇, 以免抑制下游反应。
7. 取出2号柱, 放入一个无RNA酶的离心管中, 在吸附膜的中间部位加50µl **RNase-free water** (事先在 65-70℃ 水浴中加热效果更好), 室温放置2分钟, 离心1分钟洗脱RNA。