



ZOMANBIO

本产品仅供科研使用. 请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

总 RNA 提取试剂 (RNApure)

版本: 2018/07/25

Total RNApure Reagent

Catalog # ZP401

目录编号	产品名称	包装单位
<input type="checkbox"/> ZP401-1	Total RNApure Reagent	50ml
<input type="checkbox"/> ZP401-2	Total RNApure Reagent	100ml

Store at 4°C 避光保存 9-12 个月

产品简介:

本产品 RNApure Reagent 是可即用的从细胞和组织中提取总 RNA 的试剂, 在样品裂解过程中, 可保持 RNA 完整性, 同时裂解细胞, 溶解细胞内含物。加入氯仿后, 溶液分为水相和有机相, RNA 在水相, 用异丙醇可沉淀回收 RNA; 中间层用乙醇沉淀可回收 DNA; 有机相用异丙醇沉淀可回收蛋白。

预防 RNA 降解, 应注意以下方面:

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌, 可能导致 RNase 污染。
2. 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA 在本试剂中时不会被 RNase 降解, 但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150°C 烘烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟, 然后用水彻底清洗, 再灭菌, 即可去除 RNase。
4. 配制溶液应使用 RNase-free ddH₂O。将水加入到干净的玻璃瓶中, 加入 DEPC 至终浓度 0.1%(V), 放置过夜, 高压灭菌。

RNA 提取操作步骤:

准备试剂: 氯仿、异丙醇、RNase-free ddH₂O、75% 乙醇(用 RNase-free ddH₂O 配制)。

1. 匀浆处理

- a. **植物组织:** 以叶片 RNA 提取为例。取新鲜叶片在液氮中充分研磨或将叶片剪碎后直接在 RNApure 中研磨, 研磨要迅速, 最好不要超过 1 分钟。每 50-100mg 叶片加入 1ml RNApure。
- b. **动物组织:** 以小鼠肝脏 RNA 提取为例。取新鲜或 -70°C 冻存组织, 每 30-50mg 组织加入 1ml RNApure, 进行匀浆处理。样品体积一般不要超过 RNApure 体积的 10%。



c. **单层培养细胞:** 单层贴壁细胞的收集 (收集细胞数量请不要超过 1×10^7) : 可直接在培养容器中裂解 (容器不超过 10cm^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 10cm^2 面积加入 1ml RNApure。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。

d. **细胞悬液:** 离心取细胞。每 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 动物、植物和酵母细胞或每 10^7 细菌细胞加入 1ml RNApure。加入 RNApure 前不要洗涤细胞, 以免降解 RNA。一些酵母和细菌细胞可能需要匀浆处理。

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

2. 将匀浆样品室温静置 5 分钟, 使得核酸蛋白复合物完全分离。

3. 可选步骤: 4°C 12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 10 分钟, 取上清。

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, 可离心去除。

4. 每使用 1ml RNApure 加入 0.2ml 氯仿, 盖好管盖, 剧烈振荡 15 秒 (涡旋亦可, 务必充分振荡, 确保抽提效果) , 室温静置 3 分钟。

5. 4°C 12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 10-15 分钟, 样品会分成三层: 有机相、中间层和上层无色的水相, RNA 主要在水相中, 将水相 (约 $500\mu\text{l}$) 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 分钟。

7. 4°C 12000rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 10 分钟, 去上清, 离心后在管侧和管底形成胶状沉淀。

8. 加入 1ml 75% 乙醇 (DEPC 处理过的水配制) , 剧烈涡旋 (每使用 1ml RNApure 至少用 1ml 75% 乙醇对沉淀进行洗涤) 。

9. 4°C 10000rpm ($\sim 9391 \times g$) 离心 5 分钟, 倒出液体, 注意不要倒出沉淀, 剩余的少量液体短暂离心, 然后用枪头吸出, 注意不要吸弃沉淀。

10. 室温放置晾干 (大约 2-3 分钟, 不要晾的过干, RNA 完全干燥后会很难溶解) , 根据实验需要, 加入 $30-100\mu\text{l}$ RNase-free ddH_2O , 反复吹打、混匀, 充分溶解 RNA。保存样品于 -70°C 以备长期使用。