TRIpure 总 RNA 快速提取试剂盒
（柱式法）
使用手册

Ver:200301

用于各种动物组织、细胞的总 RNA 提取

样本容量大，适用类型多，优秀的纯度和产量

使用 DNase I 柱上消化 DNA，彻底去除基因组 DNA 残留

◇产品编号：RN03

◇常温运输、保存（15-25℃）

◇本产品仅供科研使用

成都百菲特科技有限公司

一、产品概述：

本试剂盒使用 TRIpure Reagent 作为裂解液，具有样本容量大、适用类型多的特点，同时使用吸附柱捕获 RNA，相比单独使用 TRIzol 试剂和异丙醇沉淀，不但能进一步提高 RNA 纯度，还能简化流程，节省大量的操作时间，非常适合一次性从大量组织或细胞中提取总 RNA（例如转录组测序前的 RNA 制备）。提取过程中使用 DNase I 在吸附柱上消化 DNA，彻底去除基因组 DNA 残留。

对于常见的组织或细胞，也可以使用组织细胞 RNA 快速提取试剂盒，不但拥有更简化的操作流程，同样可以提供优秀的 RNA 纯度和产量，并可以避免使用氯仿。但对于肌肉、心脏、肝脏一类的样本，仍然建议使用 TRIpure Reagent 总 RNA 快速提取试剂盒。

二、规格及组成：

组　分	RN03050（50rxn）
TRIpure Reagent	50 ml　（2-8℃避光保存）
70%乙醇	30 ml
去蛋白液 RW1	40 ml
漂洗液	50 ml
RNase-free H_2O	10 ml
RNA 吸附柱	50 个
使用手册	1 份
■Recombinant DNase I (1U/μl)	350 U　（选配）
■DNase I Buffer	3 ml　（选配）
■漂洗液	50 ml　（选配）
■漂洗液 RW2	30 ml　（选配）
自备试剂	氯仿或二氯甲烷

三、注意事项：

1. TRIpure Reagent 可以常温运输，收到后建议在 2-8℃避光保存。

2. TRIpure Reagent 含有酚，接触皮肤会导致灼伤，去蛋白液 RW1 和漂洗液 RW2 中含有刺激性化合物，建议操作时戴乳胶手套、口罩及护目镜，避免沾染皮肤和衣服。若不慎沾染皮肤、眼睛时，用大量清水或生理盐水冲洗，必要时及时就医。

3. 开封后的 RNase-free H_2O 不能再次标识为无菌状态，为避免存储过程中微生物滋生，建议装入自封袋后在 2-8℃保存，必要时可以使用新的 RNase-free H_2O 进行洗脱。

4. 在 RNA 提取过程中应使用无酶的离心管及耗材，防止因耗材污染导致 RNA 降解。

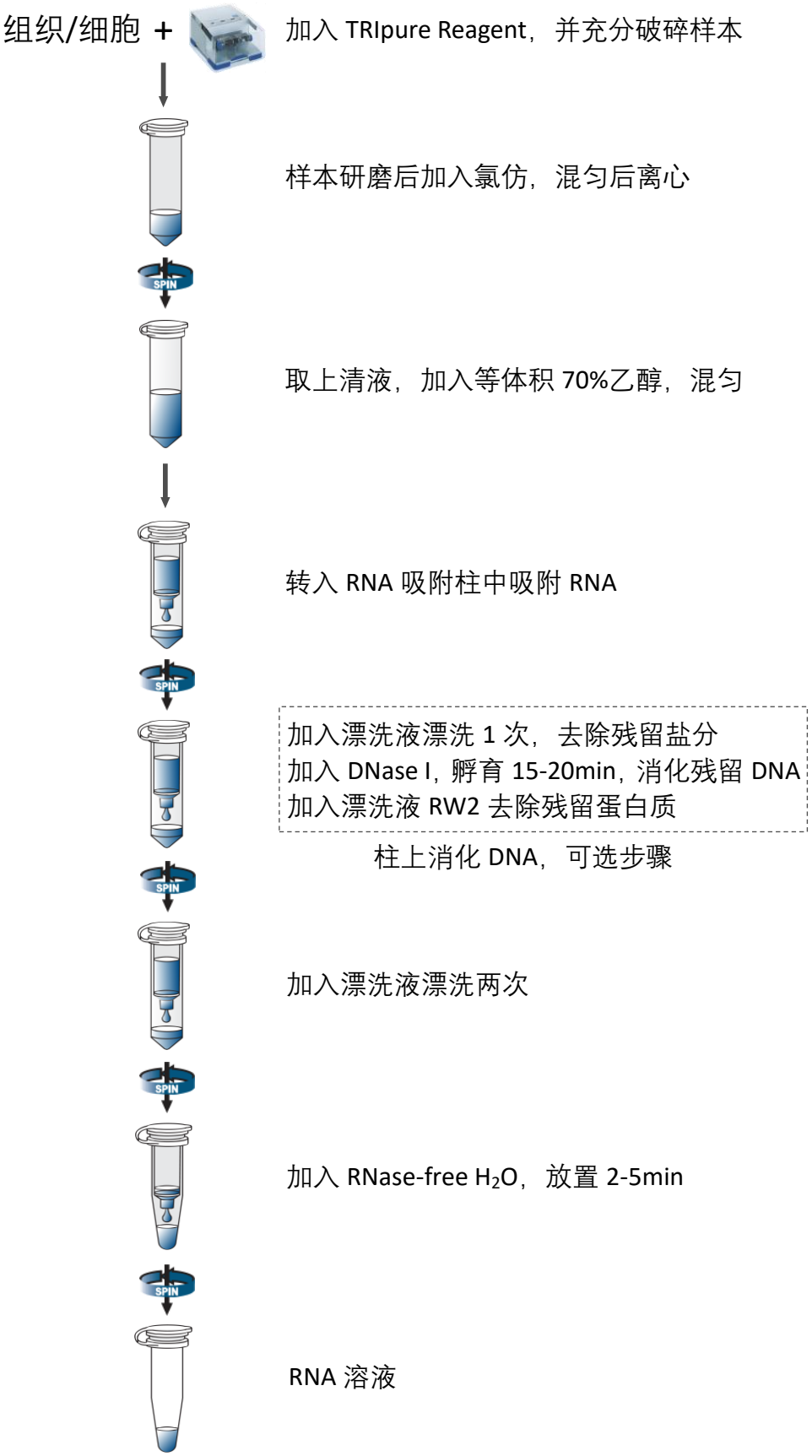
5. 对于公用的电泳槽及制胶板，在进行 RNA 电泳前应进行清洗，防止 RNA 在电泳过程中降解而误判 RNA 提取失败。推荐使用固相 RNase 清除剂。

6. 经常清洁离心机转子及腔室，防止残留液体形成气溶胶污染；使用离心管离心时，禁止开盖离心。

7. 为确保离心参数稳定，本手册使用相对离心力来标定离心机的转数，如"室温，12,000×*g* 离心 5min"表示在当前温度下离心 5min，离心机在对应转速下产生的相对离心力约为 12,000 倍地球引力。通常在离心机上被标识为"RCF"（Eppendorf）或"×*g*"(Thermo)。

8. 对于在-80℃或液氮中保存的样本，直接在室温下称重会引起 RNA 降解，可以根据样本的体积来估算样本的重量，样本的分割和取样需要在干冰冰面上进行，所用的离心管、镊子、剪刀等工具也需要在干冰上提前降温，整个过程需要严格防止样本发生解冻。推荐在取样时就使用 RNA 样品保存液处理样本，处理后的样本可以在常温下分割、取样，不会影响最终 RNA 的完整性。

四、流程概要：


组织/细胞 +
加入 TRIpure Reagent，并充分破碎样本
样本研磨后加入氯仿，混匀后离心
SPIN
取上清液，加入等体积 70%乙醇，混匀
转入 RNA 吸附柱中吸附 RNA
SPIN
加入漂洗液漂洗 1 次，去除残留盐分
加入 DNase I，孵育 15-20min，消化残留 DNA
加入漂洗液 RW2 去除残留蛋白质
柱上消化 DNA，可选步骤
SPIN
加入漂洗液漂洗两次
SPIN
加入 RNase-free H_2O，放置 2-5min
SPIN
RNA 溶液

五、使用方法：

1. 根据不同类型的组织，参考下列三种方法来破碎并裂解样本：

▲组织

每50-100mg组织中加入1ml TRIpure Reagent，用匀浆器或研磨仪破碎组织样品，充分释放组织中的RNA。推荐使用研磨仪在室温下研磨破碎组织，可以避免样本间的交叉污染。组织样品的体积不能超过TRIpure Reagent 体积的10%。

▲单层生长的细胞

直接在直径3.5cm的培养板中加入1ml TRIpure Reagent，通过移液器反复吹打混匀来裂解细胞。TRIpure Reagent的用量由培养板的面积决定（每10cm^{2}加1ml TRIpure Reagent），而不是依据细胞的数量。一般情况下，普通大小的细胞培养瓶，加入1ml TRIpure Reagent，迅速轻摇使TRIpure Reagent充分和瓶底所有细胞接触，用移液器反复吹打混匀来达到裂解细胞并灭活RNA酶的目的。当TRIpure Reagent的用量不足时，可能会导致最终的RNA中有DNA污染。

▲悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀并收集细胞。每5-10×10^{6}个动物细胞、植物细胞、酵母菌细胞或每1×10^{7}个细菌加1ml TRIpure Reagent，用移液器反复吹打来裂解细胞。在加入TRIpure Reagent前应避免洗涤细胞，否则会增加mRNA降解的可能性。在裂解某些酵母菌、细菌时，可能需要使用匀浆器。

2. 在15-30℃条件下孵育5min，以便使核蛋白体完全分解。

3. **可选步骤：**在4℃条件下，12,000×*g* 离心5-10min，去除匀浆液中不溶解的物质，转移上清液到新的离心管中。

⚠ 注意：对于富含蛋白质、脂肪、细胞外物质的样本（例如肌肉、脂肪组织）建议增加本操作步骤。离心后，RNA仍然保留在上清液中，剩下的沉淀中含有细胞外膜、多糖、以及高分子量DNA，应该将清澈的匀浆液转移到干净的试管中，再加入氯仿进行后续的分离步骤。在处理脂肪组织的样品时，大量的脂肪会漂浮在最上层，这些脂肪也应该被去掉。

4. 在每1ml TRIpure Reagent中加入0.2ml氯仿，盖紧盖子，剧烈振荡30秒，室温下孵育2～3分钟。

5. 在4℃条件下，12,000×*g* 离心5-10min。沉淀细胞碎片和杂质。

正常现象：

离心结束后，溶液会分为三层：粉红色的下层有机相、白色的中间层和无色透明的上层水相。水相的体积约占加入TRIpure Reagent体积的60%。

异常现象：

a.上清液比较浑浊，通常与样本过量有关，在取出上清液后可以加入400μl氯仿重新抽提一次；

b.下层有机相为无色，上层水相仍为粉红色，通常与加入氯仿后未彻底混匀有关，再次振荡并离心。

6. 小心吸取400-500μl上层水相到RNase-free离心管中，避免吸入中间层的杂质。

7. 加入等体积的70%乙醇，立即吹打或涡旋混匀。

正常现象：

加入70%乙醇后，液体仍然保持清澈透明，不会出现浑浊或析出絮状沉淀。

异常现象：

混匀后出现浑浊或析出絮状沉淀，通常在提取肝脏样本时出现，并可能使用了过多的样本。如果已经影响到最终RNA的纯度，重复提取时可以适当减少样本用量。

8. 将上述混合物(每次最多700μl，请分多次进行离心)加入到一个RNA吸附柱中，室温，12,000×*g* 离心1min，弃掉收集管中的废液。

正常现象

通常，液体在上述离心条件下可以全部过滤，若有未过滤的液体，再次离心2-3min即可全部过滤。

异常现象：

a.液体难以过滤，延长离心时间至3min，仍有液体残留。可能与样本含有多糖（例如肝脏）或较多的蛋白质有关，这些大分子在吸附膜表面出现堆积或黏附，堵塞了吸附膜的孔隙而引起过滤困难。重复提取时可以适当减少样本用量；

b.吸附柱的塑料内圈位置出现明显的沉淀堆积或杂质。

9. 加入700μl去蛋白液RW1，静置30秒，室温，12,000×*g* 离心1min，弃掉收集管中的废液。

10. 吸附柱上消化DNA:(可选步骤)

⚠ 注意：对于大多数正常用量的样本，在步骤9结束后，吸附膜上通常只残留非常少的基因组DNA。如果后续实验已经包含DNase消化步骤或进行oligo dT吸附，则此处的“吸附柱上消化DNA”的步骤可以省略，直接进行步骤11。

10.1 加入700μl漂洗液，室温，12,000×*g* 离心1min，弃掉收集管中的废液。

10.2 室温，12,000×*g* 离心2min。此步非常重要，否则残留的乙醇会抑制DNase I的活性。

10.3 将5-6μl的Recombinant DNase I加入到45-44μl DNase I Buffer中吹打混匀配制成50μl的DNase I工作液，然后将50μl的DNase I工作液滴加到吸附柱的膜上，室温静置15-20min。

10.4 加入600μl漂洗液RW2，室温，12,000×*g* 离心1min，弃掉收集管中的废液。

11. 加入500μl漂洗液，室温12,000×*g* 离心1min，弃滤液。加入500μl漂洗液，再漂洗一次。

12. 将RNA吸附柱放回空的收集管中，室温，12,000×*g* 离心2min。

⚠ 注意：此步非常重要，否则残留的乙醇会影响RNA的使用。

13. 将RNA吸附柱放入一个RNase-free离心管中，直接在吸附膜的中间部位加50-100μl（推荐50-70μl）RNase-free H_2O，室温放置3-5min。

14. 室温，12,000×*g* 离心2min。离心管中溶液即为RNA样品，可以立即使用或存放于-80℃待用。

六、常见问题及解决办法：

常见问题	原 因	解决方案
RNA产量低	样品研磨不充分	1. 匀浆或研磨时，确保样本完全破碎，没有较大的组织或颗粒。
	组织本身RNA含量少	1. 不同类型的组织和细胞有不同含量的RNA，对于含量少的组织可以适当提高起始处理量。
RNA降解	样本保存方法不当	1. 使用新鲜样本或经液氮速冻后保存于-80℃的样本，样本保存期间，防止超低温冰箱反复升温。
	样本反复冻融	1. 保存样本时，建议按一次提取用量分装在研磨管中，并加入研磨珠，避免因反复冻融导致的降解。 2. 推荐在取样时就使用RNA样品保存液处理样本，处理后的样本可以在常温下分割、取样，也可以再次放回低温下保存，不会影响最终RNA的完整性。
	电泳槽、制胶板或者电泳缓冲液受污染	1. 如果电泳槽、制胶板出现RNase污染，建议使用固相RNase清除剂处理； 2. 使用RNase-free Water配制电泳缓冲液。
	使用的耗材存在RNase污染	1. 提取过程中使用无RNase的吸头、离心管。

产品咨询: 18040311981
公司 Q Q: 24111785
公司微信: 右侧二维码
成都百菲特科技有限公司
http://www.biofit.com.cn