

总 RNA 提取试剂



Total RNA Isolation Reagent

本产品常温运输: 避光保存于4~25°C, 保质期24个月。

货号规格

YY101	100 mL
YY101L	100 mL × 5

产品特点

-  **色彩鲜艳**——便于区分水相和有机相的分界面, 方便吸取上清;
-  **高性价比**——产品质量丝毫不逊色于进口同类产品, 而价格仅为其一半左右。

产品简介

本产品适用于从细胞和组织中快速分离RNA/DNA/蛋白质。整个实验操作简单省时, 所提取的RNA纯度高, 可用于Northern Blot、PolyA RNA富集、体外翻译、RNase保护分析、反转录等下游实验。本品含有苯酚, 如不慎接触皮肤, 应立即用大量流水冲洗。

使用说明

请确保您所使用的离心管、移液器吸头以及其它器皿未被RNase污染。金属和玻璃制品可在200°C烘烤2h以上。塑料制品和水可用0.01%的DEPC水浸泡过夜, 高压灭菌。所有溶液应使用DEPC处理后的水配制。

分离 RNA

1. 裂解匀浆:

A. 组织样品 将组织用液氮在研钵中速冻后, 碾磨成极细的粉末, 期间应不断添加液氮, 保持组织样品处于冷冻状态。按50~100 mg组织加入1 mL总RNA提取试剂(样品体积不应超过试剂体积的10%), 此时总RNA提取试剂由于低温会凝固。继续研磨, 尽量将凝固的试剂在其融化前磨成粉末, 以使总RNA提取试剂和组织粉末尽快混合充分。几分钟后, 随着研钵温度的上升, 总RNA提取试剂会慢慢融化。充分研磨匀浆样品后, 将裂解液转移到一个新的1.5 mL离心管内。若使用的组织为容易匀浆的样本, 如大脑、肝脏等, 可直接用玻璃匀浆器匀浆。

B. 贴壁培养的细胞 吸去培养板中的培养基, 按每10 cm²(相当于一个3.5 cm直径的培养皿或6孔板的一个孔的面积)培养面积直接加入1 mL总RNA提取试剂。晃动培养板, 使总RNA提取试剂反复流过培养细胞的表面, 待所有贴壁的细胞裂解后, 将裂解液转移到一个新的1.5 mL的离心管内。

C. 悬浮培养的细胞 离心收集细胞(无需洗涤细胞, 洗涤过程极有可能会使RNA降解), 按每5~10 × 10⁶个动物、植物、酵母细胞或1 × 10⁷个细菌细胞加入1 mL总RNA提取试剂, 反复吹打, 使细胞分散裂解。一些酵母细胞或细菌细胞可能需要用匀浆仪处理。

2. 裂解后的匀浆液于室温放置5 min, 使核酸和蛋白质复合体完全分离;

3. 可选: 若样品中含有较多组织碎片或多糖等不溶物质(常见于抽提植物组织RNA时), 可于4°C 12,000 × g离心10 min, 取上清液进行下一步操作;

4. 按每使用1 mL总RNA提取试剂加入0.2 mL氯仿, 剧烈震荡混匀15 s, 室温放置3~5 min;

5. 于4°C 12,000 × g离心15 min。样品将分为三层: 下层为绿色有机相, 上层为无色水相, 中间层为白色的DNA和蛋白质;

6. 吸取上层水相，转移到一个干净的离心管中。加入等体积异丙醇，室温放置10 min 沉淀RNA。小分子RNA(如microRNA等)在异丙醇沉淀过程中会大量丢失。因此如希望回收microRNA等小分子RNA，可改用2.5倍体积乙醇，于-20℃沉淀30 min 以上。如需同时纯化DNA和蛋白质，请保留有机相和中间层；
7. 于4℃ 12,000×g 离心10 min，收集沉淀。离心后，管底和管侧壁可见白色或半透明状RNA沉淀。弃上清；
8. 用1 mL 75%乙醇洗涤RNA沉淀。于4℃ 12,000×g 离心10 min，弃上清；
9. 将离心管放回离心机轻甩几秒，使残留在管壁的乙醇溶液集中到管底，用移液器吸头小心吸去残余的乙醇溶液；
10. 打开离心管盖，室温晾干RNA沉淀。一般3~5 min 即可。加入适量无RNase水溶解沉淀。

分离 DNA

1. 在上述 **分离 RNA** 第6步的有机相和中间层中，按每使用1 mL总RNA提取试剂加入0.3 mL无水乙醇，混匀，室温放置3 min，于4℃ 12,000×g 离心5 min；
2. 将上清转移到一个新的离心管内，以备后续分离蛋白。DNA沉淀用含10%乙醇的0.1 M柠檬酸钠溶液充分洗涤。按每使用1 mL总RNA提取试剂加入1 mL洗涤液，室温放置30 min，于4℃ 12,000×g 离心5 min，弃上清，重复一次；
3. 用75%乙醇洗涤沉淀。按每使用1 mL总RNA提取试剂加入1.5 mL 75%乙醇，室温放置10~20 min，期间不时颠倒混匀。于4℃ 12,000×g 离心5 min，弃上清；
4. 室温晾干DNA沉淀。用8 mM的NaOH溶液溶解DNA；
5. 将DNA溶液pH调整至7.5。按每1 mL 8 mM NaOH溶液加入160 μL 0.1 M的HEPES溶液。

分离蛋白质

1. 取沉淀DNA后的上清，按每使用1 mL总RNA提取试剂加入1.5 mL异丙醇，室温放置10 min，于4℃ 12,000×g 离心5 min，弃上清；
2. 用含0.3 M盐酸胍的95%乙醇洗涤蛋白质沉淀。按每使用1 mL总RNA提取试剂加入2 mL洗涤液，室温放置20 min，于4℃ 7,500×g 离心5 min，弃上清。重复两次后，用2 mL无水乙醇再洗一次；
3. 晾干沉淀，用1% SDS溶液溶解蛋白沉淀，必要时可于50℃加热助溶。离心，弃不溶物。上清即可用于Western Blot分析。

注意事项

1. 本品含有苯酚，如不慎接触皮肤，应立即用大量流水冲洗；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
3. 本产品仅限科研使用。