组织细胞 RNA 提取试剂盒(异硫氰酸胍提取法)

产品简介:

RNA 的种类来源比较多，提取制备的方法各异，一般有苯酚法、去污剂法和盐酸胍法，其中最常用的是苯酚法，即 Trizol 法提取 RNA，异硫氰酸胍作为强的阴离子表面活性剂，可以有效的解离核蛋白与核酸的复合体，并对 RNase 产生强烈的抑制作用，保持 RNA 的完整性，加入氯仿等试剂并离心，上层清液用异丙醇沉淀回收总 RNA。

组织细胞 RNA 提取试剂盒(异硫氰酸胍提取法)适用于从各种组织或细胞中快速分离总 RNA，既可用于小量样品(50～100 mg 组织、5×10^6 细胞)，也可用于大量样品(>1g 组织、$>10^7$ 细胞)，提取的总 RNA 质量高，可用于 Northern Blot、Dot Blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆，该试剂盒具有以下特点：①适用范围广；②操作简单，整个过程 90min 内完成；③纯度高；④污染少。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCNE0262 50T	Storage
试剂(A): RNA 提取液	30ml	RT 避光
试剂(B): 乙酸钠缓冲液	3ml	RT
试剂(C): RNA 分离液	30ml	RT 避光
试剂(D): RNA 沉淀液	30ml	RT
试剂(E): RNA 洗涤液	50ml	RT
试剂(F): RNase-free ddH2O	10ml	RT
试剂(G): RNA 保存液	10ml	RT 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、 液氮、研钵或匀浆器、低温高速离心机、低温冰箱

2、 经 RNase free 处理的移液器吸头、EP 管等耗材

3、 无菌 PBS 缓冲液

操作步骤(仅供参考):

1、 实验准备：RNA 分离液室温放置 15min 确保两相分开，无菌 PBS 缓冲液、RNA 提取液和 RNA 沉淀液冰上预冷。

2、 样品准备

1)贴壁细胞：①直接裂解：直接在培养瓶/皿中加入 RNA 提取液裂解细胞，每 10cm^2 面积加 1ml，用移液器吹打混匀。②胰蛋白酶消化：用无菌 PBS 洗涤细胞后，加入含有 0.05～0.25%胰蛋白酶的 PBS 处理细胞，当细胞脱离容器壁后，加入含有血清的培养基终止反应，将细胞溶液转移至无 RNase 的离心管中，以下参考悬浮细胞相关操作步骤。

2)悬浮细胞：收集(1～5)×10^6～10^7 动物、植物和酵母细胞或 10^7 细菌细胞加至 1.5ml 离心管，5000～6000g 离心 5min，用无菌 PBS 重悬细胞沉淀，再次 5000～6000g 离心 5min 收集细胞沉淀，去除上清，收集细胞时一定要将溶液去除干净，否则裂解不完全，降低 RNA 收获率，向沉淀中加入加入 0.5ml RNA 提取液，充分振荡混匀。

3)组织：取新鲜动物或者植物组织或者-70℃冻存组织，50～100mg 组织在液氮中充分研磨或者加入 0.5ml RNA 提取液研磨或者用匀浆器匀浆处理，样品体积一般不超过提取液体积的 10%，研磨要迅速，以 1min 为佳。

4)血液：取 0.5～1 ml 新鲜或冻存的血液，12000g 离心 5 min，去除血浆，加入 0.5ml RNA 提取液，充分振荡混匀。

3、 核酸分离：将细胞液或匀浆液转移至 1.5ml 离心管，加入 1/10 体积的乙酸钠缓冲液，颠倒混匀 5~6 次，加入等体积 RNA 分离液，颠倒混匀 5~6 次后震荡 10-20s，冰上放置 15min，使核蛋白与核酸完全分离。

4、 样品分层：12000 g 4℃离心 10～15 min，RNA 在上层水相。

5、 沉淀 RNA：吸取上层水相(约 0.5ml)转移至新的 1.5ml 离心管中(不要吸取任何中间层物质,否则会有染色体 DNA 污染)，加入等体积 RNA 沉淀液混匀，冰上放置 10～15 min，12000 g 4℃离心 10 min，离心后管侧或管底形成胶状沉淀，弃上清。

6、 洗涤 RNA：加入 1ml RNA 洗涤液轻轻洗涤沉淀，冰上放置 5～10 min，7500g 4℃离心 5 min，弃上清，室温干燥 10～30 min，不宜过分干燥，否则 RNA 难以溶解。

7、 溶解 RNA：加入 30～50ul RNase-free ddH_2O 充分溶解，-70℃长期保存或直接用于后续试验，对于肝、胰腺、肾等组织中 RNase 含量高的样品沉淀用 RNA 保存液溶解。

注意事项：

1、 样品保存：加入 RNA 提取液混匀后样品可在-70℃放置 1 月；RNA 样品可以在 70%酒精中-70℃保存 2～4 周；如果需要长期保存，应置于超低温冰箱中保存。

2、 RNA 提取液和 RNA 分离液含有腐蚀性物质，污染皮肤或眼睛后，立即用清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医生的帮助。

3、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

4、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期： 12 个月有效。

分析与定量:

1、测定样品在 260 nm 和 280 nm 的吸收值确定 RNA 的质量，按 1OD=40pg RNA 计算 RNA 的产率，OD_{260}/ OD_{280} 在 1.8～2.0 视为抽提 RNA 纯度较好，浓度在 4μg/ml 以上的样品适于用分光光度计测定。

2、进行甲醛变性琼脂糖电泳，确定 RNA 的完整性和污染情况。

3、核酸分析仪测定 RNA 的质量和纯度。

常见问题分析:

常见问题	可能原因
A_{260}/ A_{280} < 1.6	抽提得到的 RNA 沉淀未完全溶解。
	水相中混有有机相，从而存在蛋白质和 DNA 污染。
	RNA 样品用水而不是 TE 溶解。低离子浓度和低 pH 条件下，A_{280} 值会偏高。
	样品匀浆时加的 RNA 提取液太少，RNA 与蛋白质、DNA 未能完全分离。
	匀浆后样品未在室温放置或者放置时间太短，RNA 与核蛋白未完全解离。
DNA 污染	样品中含组织溶剂(如乙醇等)或碱性溶液，致水相减少或 pH 升高。
	样品匀浆时加入的试剂体积太少。如果存在 DNA 污染，可用 DNA 清除剂去除。
	水相中混有有机相，从而存在蛋白质和 DNA 污染。
RNA 产量低	样品裂解或匀浆处理不彻底，RNA 没有被完全释放出来。
	得到的 RNA 沉淀未完全溶解。
	抽提的 RNA 中含有 RNase。
RNA 降解	组织或细胞不新鲜，样品没有及时被液氮冻存，导致组织或细胞中的 RNA 降解。
	溶液或离心管未经 RNase free 处理，RNase 的污染导致 RNA 被降解。
	细胞在胰蛋白酶消化时间过长，导致未加 RNA 提取液前 RNA 已经部分降解。
	电泳时使用的甲酰胺 pH 小于 3.5，导致 RNA 发生酸解。
蛋白和多糖污染	水相中混有有机相，从而带有蛋白质和 DNA。
	样品中蛋白、多糖含量高或样品量太大，细胞未裂解完全。

相关产品:

产品编号	产品名称
GCIH0305	柠檬酸钠抗原修复液(50×)
GCIH0340	免疫染色一抗稀释液
GCPE0103	Acr-Bis(30%,29:1)
GCPW0082	丽春红 S 染色液(1×Ponceau S)
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)