

M5 Liquid Sample Total RNA Extraction Reagent (TRIgent LS) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Liquid Sample Total RNA Extraction Reagent (TRIgent LS)	100ml	MF034-plus-01
M5 Liquid Sample Total RNA Extraction Reagent (TRIgent LS)	5×100ml	MF034-plus-05

【储存条件】

TRIgent LS 在室温下能稳定保存 12 个月。为达到最佳效果，聚合美建议保存 TRIgent LS 在 2~8°C 的环境下。

【产品简介】

TRIgent LS 试剂是直接来源于人，动植物，酵母，细菌和病毒的液体样品中提取总 RNA 的试剂。也可以从动物组织、植物材料、各种微生物及培养细胞等样品中提取总 RNA。

该方法对少量的组织(50-100mg)和细胞(5×10^6)以及大量的组织($\geq 1g$)和细胞($> 10^7$)均有较好的分离效果。样品在 TRIgent LS 中被充分裂解的同时能够最大限度地保证 RNA 的完整性。在加入氯仿离心后，溶液会分成三层：上层无色水相、中间层和下层有机相，RNA 分布在上清层中。收集上清层后，经异丙醇沉淀便可以回收得到总 RNA。

提取的总 RNA 完整性好，无蛋白和 DNA 污染，可用于各种分子生物学常规实验，如 RT-PCR、Real-time RT-PCR、Northern blot、Dot Blot、体外翻译等。

TRIgent LS 试剂能促进不同种属不同分子量大小的多种 RNA 的析出。例如，从大鼠肝脏抽提的 RNA 琼脂糖凝胶电泳并用溴化乙锭染色，可见许多介于 7kb 和 15 kb 之间不连续的高分子量条带(mRNA 和 hnRNA 成分)，两条优势核糖体~5 kb(28S)和~2 kb(18S)，低分子量 RNA 介于 0.1 和 0.3 kb 之间 (tRNA, 5S)。当抽提的 RNA 用 TE 稀释时其 A_{260}/A_{280} 比值 ≥ 1.8 。

注意如果是普通琼脂糖凝胶电泳，28S 的位置大约在 2kb，18S 大约在 1kb 的位置，不同浓度的凝胶位置变化较大。

【注意事项】

1. **本品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会导致中毒、灼伤以及其他身体伤害。使用本制品时应穿戴防护物品，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不小心中接触，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。**
2. 样品匀浆后，如果不即刻加入氯仿之前，置于-70°C 下可放置一个月以上。保存在 75%乙醇中的 RNA 沉淀，2-8°C 可以保存一周，-20°C 条件下可以保存 1 年。RNA 半衰期比较短，容易降解，建议提取后尽快进行后续实验，如反转录成 cDNA，Northern Blot 等。
3. 若下游实验对 DNA 非常敏感，建议用 RNase free DNase I 对 RNA 进行处理。
4. 自备试剂：氯仿、异丙醇（新开封或提取 RNA 专用）、75%乙醇(用 DEPC 处理过的水配制)、RNase free water 或者 DEPC 处理过的水。

【操作步骤】

<友情提示>:

- 1) 抽提 RNA 时要戴手套和护眼罩。避免接触皮肤和衣服。
- 2) 在化学通风橱完成操作。避免呼吸道吸入。
- 3) 如无特殊说明,所有的操作应该在在 15~30°C 的室温条件下。

1. 匀浆

- a. 生物液体: 每 0.25ml 液体样品(血清, 血浆, 脑脊液等等)加入 0.75ml TRIgent LS, 用加样枪吹打液体样品几次以帮助裂解样品中细胞。每 $5\sim 10\times 10^6$ 个细胞至少加入 0.75ml TRIgent LS。TRIgent LS 和液体样品的终体积比总是 3:1。
- b. 动物组织: 用 glass 或强力匀浆器搅匀组织样品, 每 50~100mg 组织或者 0.25ml 组织悬液加 0.75ml 的 TRIgent LS。一般 50~100mg 组织体积都要小于 0.25ml, 如果组织样品的体积小于 0.25ml, 加入灭菌水将组织样品体积调整到 0.25ml 以保证体积比例是 3:1。
- c. 单层生长细胞: 直接往直径 3.5 cm 的培养板中加入 0.3ml-0.4ml 的 TRIgent LS 裂解细胞, 用加样枪吹打帮助充分裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的 TRIgent LS 量 (每 10cm^2 加 0.3-0.4ml)。不需要往裂解物里面加水, 因为培养板上附着残留的培养液已经充分稀释了 TRIgent LS。

注意: 贴壁培养细胞往往不能完全从培养瓶(皿)脱落, 这并不意味着裂解不完全, 此时细胞膜实际已经完全破裂开, 并已释放出 RNA, 继续做即可。

- d. 细胞悬液: 通过离心来沉淀细胞。在 TRIgent LS 试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每 $5\sim 10\times 10^6$ 的动物细胞, 植物或酵母菌细胞或每 1×10^7 细菌加 0.75ml 的 TRIgent LS。和步骤 b 一样用灭菌水调节样品体积到 0.25 毫升。在加入 TRIgent LS 前应避免洗涤细胞, 因为那样会增加 mRNA 降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。
- e. 植物组织: 取新鲜植物组织在液氮中充分研磨或将植物组织剪碎后直接在 TRIgent LS 中迅速研磨, 每 50-100mg 组织加入 0.75ml TRIgent LS, 和步骤 b 一样用灭菌水调节样品体积到 0.25 毫升, 混匀。

2. 将匀浆样品剧烈震荡后在室温条件下放置 5 分钟以使核蛋白体完全解离。

3. 可选步骤: 在 4°C 的条件下以 12,000 rpm 的离心力离心 10 分钟, 取上清。

如样品中含有较多蛋白质, 脂肪, 多糖或肌肉, 植物的块茎结节等可离心去除。离心后的沉淀中包含有细胞外膜, 多糖, 以及高分子量 DNA, 上清中含有 RNA。处理脂肪组织的样品时, 上层是大量油脂应除去。取澄清的匀浆液进行下一步。

4. 每 0.75ml TRIgent LS 加 0.2ml 氯仿。盖紧管盖, 剧烈震荡 15 秒并将其在室温下放置 2~3 分钟。

5. 在 4°C 12,000 rpm 的离心力高速冷冻离心 10-15 分钟。离心后混合物分成三层: 下层有机苯酚氯仿层, 中间层, 上层无色的水样层。RNA 无一例外地存在于水样层当中。水样层的容量大约为所加 TRIgent LS 容量的 70%。(有机层和中间层是蛋白和 DNA, 如果需要提取, 请联系我们索取提取方法)。

6. 将水样层转移到一干净的离心管中, 加入等体积异丙醇。颠倒混匀后室温放置 10 分钟。

RNA 沉淀在离心前通常不可见, 离心后在管侧和管底形成胶状沉淀。

7. 在室温或者 4°C 12,000 rpm 离心 10 分钟, 弃上清。

8. 加入 75%乙醇洗涤沉淀。每使用 0.75ml TRIgent LS 用 1ml 75%乙醇对沉淀进行洗涤。

9. 在室温或者 4°C 12,000 rpm 离心 3 分钟, 弃上清, 注意不要丢失 RNA 沉淀。

注意: 剩余的少量液体可短暂离心, 然后用枪头吸出, 注意不要吸弃沉淀。

10. 室温放置 2-3 分钟, 晾干。加入 30-100 μ l RNase free 水, 充分溶解 RNA, 得到的 RNA 保存在-70°C, 防止降解。

注意: 沉淀不要过分干燥, 以免难于溶解。

【附注 RNA 纯度及浓度检测】

A、完整性： RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件：胶浓度 1.2%；0.5×TBE 电泳缓冲液；150v，15 分钟)检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA，电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。动物 rRNA 大小分别约为 5 kb 和 2kb，分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍，否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

B、纯度： OD_{260}/OD_{280} 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA， OD_{260}/OD_{280} 读数 (10mMTris, pH7.5) 在 2.1-2.2 之间 (100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右，很多公司无法达到这个标准，所以 1.9-2.0 就凑合用了，但是我们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2)。 OD_{260}/OD_{280} 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品，假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD_{260}/OD_{280} 读数 1.8-2.1 之间，在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间，但这并不表示 RNA 不纯。

C、浓度： 取一定量的 RNA 提取物，用 RNase-free 水稀释 n 倍，用 RNase-free 水将分光光度计调零，取稀释液进行 OD_{260} , OD_{280} 测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度 (ng/μl) = $(OD_{260}) \times (\text{稀释倍数 } n) \times 40$ 。

**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。