

## 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，可以有效地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 ~ 100mg组织、 $5 \times 10^6$ 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

名称	编号	ADS051NEO	Storage
	50T		
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 dd H <sub>2</sub> O		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
- 2、经RNase free处理的移液器吸头、EP管等耗材
- 3、低温高速离心机、低温冰箱
- 4、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<sup>2</sup>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<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>动物、植物和酵母细胞或10<sup>7</sup>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0.5mlRNA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0.5mlRNA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0.5~1ml新鲜或冻存的血液，12000g离心5min，去除血浆，加入0.5mlRNA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：12000g 4℃离心10~15min，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10~15min，12000g4℃离心10min，离心后管侧或管底形成胶状沉淀，弃上清。
- 6、洗涤RNA：加入1mlRNA洗涤液轻轻洗涤沉淀，冰上放置5~10min，7500g4℃离心5min，弃上清，室温干燥10~30min，不宜过分干燥，否则RNA难以溶解。
- 7、溶解RNA：加入30~50ulRNase-free dd H<sub>2</sub>O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。

**有效期：**12个月。

**分析与定量：**

- 1、测定样品在260nm和280nm的吸收值确定RNA的质量，按1OD=40pgRNA计算RNA的产率，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>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
<b>A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> &lt; 1.6</b>	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 <sub>280</sub> 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。
<b>DNA污染</b>	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。
<b>RNA产量低</b>	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。
<b>RNA降解</b>	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。
<b>蛋白和多糖污染</b>	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。