



ELK Biotechnology

For research use only.

TRIpure Total RNA Extraction Reagent

RNA 提取试剂 TRIpure 使用说明

产品描述

TRIpure Total RNA Extraction Reagent 是一种用于各种动植物、细菌组织/细胞总 RNA 抽提的试剂，具有极强的裂解能力，可在短时间内裂解细胞和组织样本，保持样品中 RNA 的完整性，有效抑制 RNA 的降解。样品在该试剂中能够充分被裂解，在加入氯仿离心后，溶液会形成上清层、中间层和有机层（鲜红色下层），RNA 分布在上层水相中，收集上清层后，经异丙醇沉淀便可回收得到 Total RNA。提取的总 RNA 纯度高，基本不含蛋白质及基因组 DNA，可直接用于 Northern、点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RT-PCR、poly(A)+选择、RNA 酶保护分析以及构建 cDNA 文库等多种分子生物学实验。

此外，在除去水相层后，样品中的 DNA 和蛋白也能相继以沉淀的方式还原。乙醇沉淀能析出中间层的 DNA，在有机层中加入异丙醇能沉淀出蛋白。

本品操作简单快速，所有操作可以在一小时内完成。且对少量的组织(50-100mg)和细胞(5×10^6)以及大量的组织($\geq 1g$)和细胞($> 10^7$)均有较好的裂解效果。

运输与保存方法

冰袋 (wet ice) 运输。产品 4°C 避光保存，一年有效。

注意事项

- 1) 需自备氯仿、异丙醇（新开封或提取 RNA 专用）、75%乙醇 (DEPC 水配制)、DEPC 和 DEPC 水。
- 2) 戴一次性干净手套；在单独的洁净的区域操作；在操作过程中避免讲话，以防实验者汗液、唾液中的 RNase 的污染。
- 3) 请尽量使用 RNase free 的实验器具，包括枪头和离心管。耐高温器物可 150°C 烘烤 4 小时以去除 RNA 酶，其它器物去除 RNA 酶可考虑用 0.1% 的 DEPC 水浸泡过夜，然后灭菌，烘干。溶液需用 DEPC 水配制。RNA 实验用的器具和试剂应专门使用，不要用于其它实验。DEPC 水建议分装后保存。
- 4) 本产品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会中毒、导致灼伤以及其他身体伤害。使用本产品时应穿戴防护物品，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不小心接触到眼睛时，应立即用大量的水冲洗以及前往医院治疗；
- 5) 样品用 TRIpure 匀浆后，如果不即刻加入氯仿进行下游实验，可先于 -70°C 下冻存，可保存一个月以上。另保存在 75%乙醇中的 RNA 沉淀，可于 4°C 保存 1 周，-20°C 保存 1 年。



ELK Biotechnology

For research use only.

6) RNA 半衰期比较短, 易降解, 建议抽提后尽快进行后续实验。

参考用量

表 1 每 1 ml TRIpure 能够充分裂解的最大样本量如下:

贴壁细胞	10 cm ² 培养面积
悬浮动植物细胞或酵母细胞	5 × 10 ⁶ -1×10 ⁷ 个
细菌	10 ⁷ 个
全血	200 μl
动物组织	30-100 mg
植物组织 (多糖和多酚含量不高的)	50-100 mg

*过多的样本量可能会导致裂解不充分, 并使产物纯度降低。



ELK Biotechnology

For research use only.

操作流程

1. 样品的处理

1.1 样品的匀浆

A. 贴壁细胞

尽量弃去培养液，直接往直径 3.5cm 的培养板中加入 1ml TRIpure 覆盖并反复吹打裂解细胞。

【注】：

- 1) 依据培养板的面积而不是细胞的数量来决定所需的 TRIpure 量 (每 10cm² 加 1ml) 。
- 2) 当加入 TRIpure 量不足时可导致抽提的 RNA 有 DNA 污染。
- 3) 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，此时细胞膜实际已完全裂开，并已释放 RNA，继续后续实验即可。

B. 悬浮细胞

离心收集细胞，每 5×10^6 - 1×10^7 个细胞加入 1 ml TRIpure，用移液器反复吹打直至无明显颗粒样存在。

【注】：在加入 TRIpure 前避免洗涤细胞，否则会增加 mRNA 降解的可能性。裂解某些酵母和细菌可能需要使用匀浆器。

C. 全血

取 200ul 全血，加入 1ml TRIpure，用移液器反复吹打混匀。

D. 动/植物组织

取新鲜动植物组织或 -70°C 冻存动物组织在液氮中充分研磨，按照表 1 加入适当量 TRIpure 混匀。或取新鲜动植物组织尽量剪碎，加入适当 TRIpure 量，匀浆仪进行匀浆处理。

【注】：样品体积一般不要超过 TRIpure 体积的 10%。

1.2 将匀浆样品剧烈震荡后在冰上放置 5 分钟以使核蛋白体完全解离。

1.3 (可选) 在 4°C 条件下，12000 rpm 离心 10min，取上清。

【注】：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。处理脂肪组织样品时，上层是大量油脂应尽量去除，取澄清的匀浆液进行后续实验。

2. 总 RNA 提取

2.1 向上述裂解液中加入 300μl 的氯仿。盖紧离心管盖，剧烈震荡 15 秒，室温静置 2-3min。

2.2 12,000 rpm 4°C 离心 10-15 分钟。



ELK Biotechnology

For research use only.

【注】：

1) 离心后混合物可分 3 层：上层无色水样层，中间层，下层红色有机苯酚氯仿层。RNA 存在于水样层中。

2) 该部分容量大约为所加 TRIpure 总量的 50-60%。如用 1 ml TRIpure 提取，上层水相约为 500-600 μ l。建议吸取 400-500 μ l，不要吸的太完全，以防吸到中间层导致基因组污染。

3) 有机相和中间层是蛋白和 DNA，如有需要，请予以保留，并进行相关纯化实验。

2.3 小心吸取上层水相至一个新的离心管中，加入等体积的异丙醇。颠倒混匀后-20°C放置 20min。（RNA 沉淀在离心前通常不可见，提取量大时离心后在管侧和管底形成胶状沉淀。）

2.4 12,000rpm 4°C 离心 10 分钟。

2.5 小心弃去上清，加入 1 ml 用 DEPC 水配制的 75%乙醇。充分洗涤管盖和管壁，并轻弹管底，让沉淀悬浮起来。每使用 1ml TRIpure 用 1ml 75%乙醇对沉淀进行洗涤。

2.6 12,000 rpm 室温或 4°C 离心 5 分钟，弃去上清，注意不要丢失 RNA 沉淀。

【注】：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。

2.7 室温放置 2-3min，晾干。加入 30-100ul RNase free water（DEPC 水），待完全溶解后，取少量检测，其余在-70°C 保存。

3. 产物检测

A. 完整性检测

1) 取 1 μ l RNA 加入适当 10 \times DNA loading buffer，混匀。

2) 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。若能看见清晰的三条带，证明 RNA 完整性较好。

【注】：如果是普通的琼脂糖凝胶电泳，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。

B. 纯度检测

检测 260 nm, 280 nm 吸光度值，并计算 OD_{260}/OD_{280} 。纯的 RNA 的比值应在 1.9-2.2 之间。