

RNA-simple isolation Reagent

组分	AF508A	AF508B
RNA-simple isolation Reagent	100ml	200ml

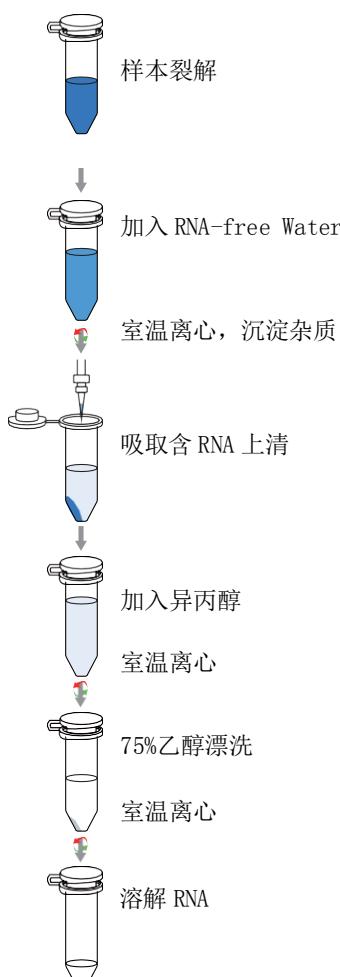
产品说明

适用范围：

常规动物组织(如：肝脏、心脏、肾脏、脑组织、骨骼肌等，不包括脾脏和肺脏)、植物组织(如水稻、玉米、拟南芥、烟草、小麦、大豆等，不包括棉花)、各类细胞系均具有极佳的提取效果。

保存条件：2-8°C

提取试剂操作流程：



RNA-simple isolation Reagent 广泛适用于从各类动物组织、植物材料、培养细胞、细菌等样品中提取 Total RNA 和 Small RNA。与传统 Trizol 一样属于通用型 Total RNA 提取试剂，与传统 Trizol 提取方法相比，本产品使用方法简单，不需要使用氯仿进行分层，且全程可在常温进行；此外，本产品在高效地抑制 RNA 酶(Rnase)活性的同时，将蛋白质、DNA、多糖等杂质沉淀到管底，从而实现单相提取，并有力保证了 RNA 的完整度和纯度。使用本产品在 50min 内即可完成全部的提取过程，提取的 RNA 可以直接用于 cDNA 克隆、qRT-PCR 检测、mRNA 纯化、体外翻译、Northern blotting 杂交、高通量测序等各种分子生物学实验。

使用方法

1. 样本处理

1) 动物/植物组织

① 将新鲜组织经液氮速冻后，迅速转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨，期间不断加入液氮，直至研磨成粉末状(无明显可见颗粒)。

▲研磨不彻底会影响 RNA 的得率和质量。

② 将研磨成粉的样品转移至离心管中，大约每25mg组织加入500ul本试剂，剧烈振荡或移液枪吹打，使样品充分裂解。

▲每500ul本试剂最多可以裂解50mg常规组织，过多的样本量可能会导致裂解不充分，并使产物纯度降低。

▲部分韧性极强或含较多外基质的组织，可能会出现不能完全溶解的现象，在下一步操作 RNA 提取的步骤 2) 中将进入沉淀中，不会影响后续 RNA 提取及 RNA 质量。

▲若没有条件用液氮研磨，可将新鲜组织尽量剪碎浸泡在本试剂中，用电动匀浆器高速匀浆至组织块彻底裂解。

2) 悬浮细胞

① 离心收集细胞，将获得的细胞沉淀用1×PBS重悬，再次离心，弃尽上清。

② 加入本试剂，每 $1 - 5 \times 10^6$ 个细胞加入500ul本试剂。

③ 用移液器反复吹打直至充分裂解。

3) 贴壁细胞

① 弃去细胞培养液，用1×PBS清洗一次。

② 通常，每10cm直径的细胞培养皿培养的细胞加入2-3ml本试剂，常规六孔板(孔直径3.5cm)每孔加500ul本试剂，使之充分覆盖到细胞表面，然后用移液器将细胞吹打下来。

▲对于贴壁牢固的细胞(细胞团)可采用细胞刮或洁净的枪头剥离，亦可在加入本试剂之前采用胰酶将细胞消化下来，然后按照悬浮细胞处理。

③ 将裂解液转移至离心管中，用移液器反复吹打直至充分裂解。

2. RNA提取

1) 向上述裂解液中加入2/5体积的Rnase-free Water(每500ul本试剂使用200ul)，上下颠倒混匀，室温静置5min。

2) 12,000×g 室温离心15min。

3) 取出离心管，此时溶液分成上层水相(含RNA)和深色的下层沉淀(含蛋白质、DNA、多糖等杂质)，小心吸取上层水相至一个新的离心管中。

▲上层水相的体积约占总体积的 90%，如用 500ul 本试剂进行提取，上层水相约为 640ul，建议吸取 500ul；针对微量的样本进行提取时，为减少 RNA 损失，可以全部转移上清。

▲当样本的投入低于推荐量时，离心后可能不会出现下层沉淀，属于正常现象，可继续按后续步骤完成提取。

4) 加入等体积异丙醇，上下颠倒混匀，室温静置10min。

5) 12,000×g 室温离心10min，通常可以看见白色沉淀，小心弃去上清。

▲部分组织材料由于含有较多的代谢产物，导致沉淀不能聚集而分散在离心管壁上，此时，请沿液面缓慢吸取上清。

6) 加入500ul 75%乙醇(Rnase-free Water配制)，轻弹管底让沉淀悬浮起来，并上下颠倒数次。

7) 8,000×g 室温离心3min，弃去上清。

8) 重复步骤6和7一遍，弃尽上清。

▲为减少杂质残留，应尽可能的将上清弃干净。建议弃去大部分上清后，短暂离心将残留液体甩至管底，再用移液器将剩余液体全部吸掉。

9) 室温放置晾干，加入适量的Rnase-free Water溶解沉淀，室温涡旋3min(或使用移液器反复吹打)，使RNA沉淀充分溶解。提取的RNA产物可以分装后在-85~-65℃长期保存，在-30~-15℃仅可短期保存。

▲RNA沉淀晾干 2-3min 即可，不要过度晾干，RNA完全干燥后会很难溶解。

▲RNA产物需要充分溶解，否则可能导致浓度定量失准以及 OD260/OD280 比值偏低。

3. 产物检测

1) 产物纯度可用分光光度计检测，OD260/OD280比值在1.8-2.2之间表明RNA纯度较高。

2) 产物浓度可以采用分光光度计检测，RNA浓度(ng/ul)=OD260×稀释倍数×40；或者采用Qubit直接检测。

3) 取0.5-1ug RNA，用1×TE或Rnase-free Water稀释至8ul，再加入1ul 10×DNA loading buffer，混匀，进行1%琼脂糖凝胶电泳；或采用2100检测，测定RNA产物的RIN值。

常见问题及解决方案

1. RNA发生降解

RNA降解可能发生在多个环节，实验过程中需要注意以下事项：

① 确保提取RNA的试剂和器具没有被Rnase污染，所有离心管、枪头及相关溶液都必须无Rnase污染，耐高温器物可于150℃烘烤4-6h以去除Rnase，其它器物可用0.1%DEPC水浸泡过夜；

② 做好防护工作，戴口罩和一次性干净手套，并在单独的洁净区操作；

③ 细胞或组织样品需立即加入本试剂，并迅速进行匀浆裂解。若处理不当，发生细胞或组织冻融，Rnase会被释放出来降解RNA。针对内源Rnase含量高或不易匀浆的组织，需将组织切成小块后立即投入液氮冷冻，然后进行研磨，在整个研磨过程中，样品不得融化；

④ 提取的RNA样品需要妥善保存，建议取少量进行检测，其余样品分装于-85~-65℃保存。

进行电泳检测可以提高电压并缩短跑胶时间，同时对电泳缓冲液进行冰浴降温，防止跑胶过程中RNA发生降解。

2. 出现污染

① 蛋白质污染：采用分光光度计检测提取产物OD260/OD280偏低时，提示可能存在蛋白质污染。遇到此种情况，需要考是否组织投入量过大，导致裂解不充分，可以适当增加本试剂或者降低组织投入量进行提取；

② 多糖污染：采用分光光度计检测提取产物OD260/OD230偏低时，提示可能存在多糖污染，需要考虑是否是因为乙醇未去除干净或者是组织投入量过大导致，此时，可以在RNA提取步骤9时适当延长RNA晾干时间或适当降低组织投入量进行提取操作；

③ 脂肪污染：处理脂肪含量丰富的组织时，经过RNA提取步骤2之后，上层是大量脂肪，可以转移澄清的中间层进行下一步操作。

3. 加入异丙醇离心后看不见沉淀

通常情况下，经过异丙醇沉淀可以看见白色沉淀。若遇到沉淀不可见的情况，可能是RNA含量低或者组织投入量过低，建议加入异丙醇(RNA提取步骤4)后在2~8℃或-30~-15℃放置10-30min后再离心；且在RNA提取步骤5进行弃上清操作时，请采用吸取而不是倾倒的方法，以免沉淀丢失。此外，部分组织材料由于含有较多的代谢产物，导致沉淀不能聚集而分散在离心管壁上，此时，请沿液面缓慢吸取上清。

4. 如何保存组织样本

如果不能立刻提取 RNA，应将组织离体后迅速投入液氮冷冻，并用液氮保存；或液氮速冻后，转移至-85~-65℃保存。不能直接将新鲜组织放在-85~-65℃冷冻，因为样品的冻结是一个缓慢的过程，在这个过程中内源 Rnase 会将 RNA 降解。