版本号:130318

TRIpure Reagent
TRIpure Reagent 总 RNA 提取试剂

目录号：RN01

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	(RN0101)	(RN0102)
TRIpure （4℃避光）	50 ml	100 ml

❖ 储存事项：

TRIpure 在室温下能稳定保存 12 个月。尽管如此，为达到最佳效果，我们建议保存在 2~8°C 的环境下。

❖ 重要提示：

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。如果不小心接触，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。

❖ 产品介绍：

TRIpure 是广谱型总 RNA 提取试剂。实验操作快速方便，颜色鲜明，便于分层。本试剂适用范围广泛，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(≥1g)和细胞(>10^7)均有较好的分离效果。样品在 TRIpure 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、中间层和下层红色有机相，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。

TRIpure 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啶染色，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 A260/A280 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. 样品用 TRIpure 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。

2. 若下游实验对 DNA 非常敏感，建议用 RNase free DNase I（货号：RN45）对 RNA 进行处理。

3. 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。

4. **本公司生产 TRIpure Reagent 质量优异，可以完美替代 Invitrogen 的 Trizol Reagent。提取质量和下游实验完全一样。已经销售 8 年数万瓶。从无质量问题。客户如果购买本公司 TRIpure Reagent 证明不能替换 Invitrogen 的 Trizol，无条件退货，并 3 倍销售价格赔偿。**

❖ **RNA 抽提操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

提示：用 TRIpure 抽提 RNA 时要戴手套和护眼罩。避免接触皮肤和衣服。在化学通风橱完成操作。避免呼吸道吸入。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. 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TRIpure中迅速研磨，每50-100mg组织加入1ml TRIpure，混匀。注意：样品体积一般不要超过TRIpure体积的10%。

   b. 动物组织：取新鲜或-70℃冻存动物组织尽量剪碎，每30-100mg组织加入1ml TRIpure，匀浆仪进行匀浆处理。或在液氮中研磨后加入TRIpure 1ml混匀。注

意：样品体积一般不要超过TRIpure体积的10%。

c. 单层培养细胞：尽量去除干净残留培养液后直接往直径3.5 cm的培养板中加入1ml 的TRIpure覆盖并反复吹打裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的TRIpure 量（每10cm^{2}加1ml）。当TRIpure 量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

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，并已释放出全部RNA，继续做即可。

d. 细胞悬液： 离心收集细胞。 在TRIpure 试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每5~10×10^{6}的动物细胞，植物或酵母菌细胞或每1×10^{7}细菌加1ml的TRIpure。在加入TRIpure 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. 血液：推荐使用本公司的TRIpure Reagent LS(货号：RN02) ，这是全血或者液体样品专用的TRIpure Reagent，LS就是Liquid Sample 液体样品的首字母简写。相当于Invitrogen公司的 TRIzol LS 。

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 1ml TRIpure 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：下层红色有机苯酚氯仿层，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 TRIpure 容量的 50-60%。 （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 1 ml TRIpure 用 1 ml 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 30-100μl RNase free water，充分溶解 RNA，得到的 RNA 保存在-70℃，防止降解。

    注意：沉淀不要过分干燥，以免难于溶解。