

YALEPIC[®] Tryzol Plus 柱式提取试剂盒 (含 DNase I) YALEPIC[®] Tryzol Plus Columnar Isolation Kit (DNase I)

产品货号: YR23009-C

产品保存及运输条件:

DNase I 及 10× DN Buffer, 低温运输, -20°C 保存一年。其他组分常温运输; YALEPIC[®] Tryzol Reagent 2 ~ 8°C 避光保存。其他组分 10 ~ 30°C 室温保存一年。

产品概述

YALEPIC[®] Tryzol Plus Columnar Isolation Kit (DNase I) 是基于 Tryzol 改进后的柱式总 RNA 提取试剂盒, 适用于从动物组织、培养细胞、各种微生物、次生代谢较少的植物材料等样品中提取总 RNA。本试剂盒配备 TryCOM 可替代氯仿, 同时采用独特的硅基质膜吸附技术, 通过离心吸附柱在高盐状态下高效专一的结合溶液中的 RNA, 同时最大限度的有效除去蛋白质、无机盐离子及有机杂质等。提取的 RNA 可用于 RT-PCR、荧光定量 PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、Ploy(A) 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

产品组分

序号	产品组分	YR23009-C (100 T)
①	YALEPIC [®] Tryzol Reagent	120 ml
②	YALEPIC [®] TryCOM Reagent	28 ml
③	Wash Buffer RA	84 ml
④	Wash Buffer RB	24 ml
⑤	RNase-free ddH ₂ O	12 ml
⑥	DNase I	2×1000 U
⑦	10× DN Buffer	2×1 ml
⑧	Pure Columns RT with Collection tubes	100 T

适用范围

适合动物组织、植物组织、细胞、病毒、体液样本、微生物等样本。

自备试剂及仪器

无水乙醇 (新开封或提取 RNA 专用) ; 70% 乙醇 (RNase-free ddH₂O 配制) ; RNase-free ddH₂O (新开封或提取 RNA 专用) ; Nuclease-free 离心管; Nuclease-free 移液器吸头; 高速离心机; 电动匀浆仪; 涡旋振荡仪等。

实验准备及注意事项

1. 使用本试剂盒前做好防护措施, 穿戴实验服、手套、口罩等, 与常规 RNA 实验操作环境一致。
2. 使用 Nuclease-free 的移液器吸头和消耗品, 配制溶液应使用 RNase-free ddH₂O, 试剂使用完后立即盖好瓶盖, 避免交叉污染的风险。
3. 首次使用前, 向 **Wash Buffer RB** 中加入瓶标签指定体积的无水乙醇。
4. 使用前若 **Tryzol Reagent** 有沉淀, 可置于 56°C 水浴 5 min, 溶解后放置室温使用。
5. 使用新鲜样本, 若不能及时提取, 将样本立即置于液氮中, 速冻后于 -85 ~ -65°C 保存, 并避免反复冻融。
6. 样本破碎需彻底, 否则会影响 RNA 的产量; 匀浆时尽量控制温度, 防止因高温导致的 RNA 降解。
7. 样品用 **Tryzol** 匀浆后, 如不即刻加入 **TryCOM**, 置于 -85 ~ -65°C 可放置一个月。
8. RNA 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, 如暂时不使用可放置于 -85 ~ -65°C 保存。

实验流程

● 样品处理

1. 动物组织: 取新鲜组织或 -85 ~ -65°C 冻存的组织尽量剪碎, 每 30 ~ 50 mg 组织加入 1 ml **Tryzol**, 用电动匀浆器于冰上进行匀浆, 直至无明显组织块即可, 防止局部温度瞬时升高导致 RNA 降解。或在将组织在液氮中研磨后加入 1 ml **Tryzol** 混匀。(注: 样品体积一般不要超过 **Tryzol** 体积的 10%; 匀浆或者液氮研磨后的样本, 若不立即提取, 可置于 -85 ~ -65°C 保存)
2. 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 **Tryzol** 中迅速研磨, 每 30 ~ 50 mg 组织加入 1 ml **Tryzol**, 混匀。(注: 样品体积不超过总体积的 1/10, 涡旋振荡至无明显粉末团即可)
3. 培养细胞
 - 1) 贴壁细胞: 彻底吸弃培养液, 向培养板中加入 **Tryzol** (每 6 ~ 10 cm² 培养面积加入 1 ml **Tryzol**), 用取样器反复吹打使细胞裂解。也可用胰蛋白酶处理后, 将细胞溶液转移至 RNase-free 的离心管 (自备) 中, 300 ×g 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 缓慢彻底吸弃上清, 加入 1 ml **Tryzol** 混匀。(注: 收集细胞数量应 ≤ 1 × 10⁷, 应除尽细胞培养液, 避免细胞裂解不完全)
 - 2) 细胞悬液: 12,000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 得到细胞沉淀。每 5 × 10⁶ ~ 1 × 10⁷ 动物、植物和酵母细胞或每 1 × 10⁷ 细菌细胞加入 1 ml **Tryzol**。(注: 部分酵母、细菌细胞可能需要匀浆或液氮处理)
4. 血液: 取新鲜的血液, 加入 3 倍体积 **Tryzol** (推荐 250 μl 全血加入 750 μl **Tryzol**), 充分振荡混匀。

5. 可选步骤：对于蛋白、脂肪、多糖或胞外物质含量高的样品，如肌肉组织、脂肪组织或植物的块茎，可以在匀浆处理后 4°C 12,000 rpm 离心 10 min 除去不溶物质，(沉淀中含胞外物质、多糖和高分子量的 DNA) 而 RNA 在上清中。

● RNA 提取

1. 样品加入 **Tryzol** 充分混匀后，室温放置 5 min，使蛋白核酸复合物完全分离。
2. 向以上溶液中加入 1/5 体积 **TryCOM** (每使用 1 ml **Tryzol** 加入 0.2 ml **TryCOM**)，盖紧管盖，剧烈振荡 15 s，室温放置 3 min。
3. 4°C 12,000 rpm 离心 15 min，样品分为三层。无色的水相 (上层)、白色中间层以及红色的有机层。小心吸取上层水相 (约 600 μ l) 至一个新的 RNase-free 离心管 (自备) 中。(注：建议吸取略少于 600 μ l，不要吸的太彻底，以防吸到中间层导致基因组污染)
4. 在得到的水相溶液中加入等体积 70% 乙醇 (RNase-free ddH₂O 配制)，颠倒混匀 (此时可能会出现沉淀)。
5. 将上步所得溶液和沉淀全部加入到已装入收集管的吸附柱 (**Pure Columns RT with Collection tubes**) 中，一次不能加完的溶液，可分多次转入。4°C 12,000 rpm 离心 20 s，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
6. 向吸附柱中加入 700 μ l **Wash Buffer RA**，4°C 12,000 rpm 离心 20 s，弃去收集管中废液，将吸附柱放回收集管中。(如下游实验对微量 DNA 敏感，则建议用以下步骤替代步骤 6，彻底去除微量 DNA)
 - *1) 向吸附柱中加入 350 μ l **Wash Buffer RA**，4°C 12,000 rpm 离心 15 s，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。
 - *2) 配制 DNase I 混合液：取 52 μ l RNase-free ddH₂O，向其中加入 20 μ l DNase I (1 U/ μ l) 及 8 μ l 10 \times DN Buffer，混匀配制成终体积为 80 μ l 的反应液。
 - *3) 向吸附柱中加入 80 μ l 配制好的 DNase I 反应液，20 ~ 30°C 孵育 15 min。
 - *4) 向吸附柱中加入 350 μ l **Wash Buffer RA**，4°C 12,000 rpm 离心 15 s，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。
7. 向吸附柱中加入 500 μ l **Wash Buffer B** (使用前检查是否加入无水乙醇)，4°C 12,000 rpm 离心 20 s，弃去收集管中废液，将吸附柱放回收集管中。
8. 重复步骤 7 一次。
9. 4°C 12,000 rpm 离心 2 min，弃去收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，彻底晾干。(注：乙醇残留会影响后续的酶促反应，应将吸附柱晾干，彻底去除残余的乙醇)
10. 将吸附柱置于一个新的 Nuclease-free 离心管中，向吸附柱的中间部位悬空加入 30~50 μ l **RNase-free ddH₂O**，室温静置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，收集 RNA 溶液，提取的 RNA 可直接用于下游实验或于 -85 ~ -65°C 保存，防止降解。

注：

- 1) RNase-free ddH₂O 体积不应小于 30 μ l，体积过小影响回收率。
- 2) 如需提高 RNA 产量，可用新的 30 ~ 50 μ l RNase-free ddH₂O 滴加至膜中重复步骤 10。
- 3) 如果要提高 RNA 浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤 10。

产物检测

1. 纯度检测: 产物纯度用分光光度计检测, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8 ~ 2.2 之间表明 RNA 纯度较高。
2. 浓度检测: 产物浓度可以采用分光光度计检测, RNA 浓度 ($ng/\mu l$) = $OD_{260} \times$ 稀释倍数 $\times 40$; 或者采用 Qubit 直接检测。
3. 完整性检测: 取 0.5 ~ 1 μg RNA, 稀释后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳或采用 2100 检测, 测定 RNA 的 RIN 值。

常见问题与解决方案

1. 组织样本保存方案

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 $-85 \sim -65^{\circ}C$ 保存。此外, 针对不具备液氮速冻条件的情况, 可将新鲜组织充分浸泡在 YALEPIC® Tissue DNA/RNA Storage Reagent (YALI#YS21071) 中, 室温可存放一周, $2 \sim 8^{\circ}C$ 存放一个月, $-20^{\circ}C$ (或 $-85 \sim -65^{\circ}C$) 长期保存。

2. 排除基因组 DNA 污染

向裂解液中加入 TryCOM 后, 需要在低温下 ($2 \sim 8^{\circ}C$) 高速离心。离心后, RNA 被抽提到上层的水相中, 下层是有机相, 含有 TryCOM, DNA 即存在于中层。吸取上层液时, 应非常小心, 避免吸到中间层和下层。

3. RNA 产物保存方案

提取的 RNA 产物可以分装后在 $-85 \sim -65^{\circ}C$ 长期保存, 在 $-20^{\circ}C$ 仅可短期保存。若在产物中加入 YALEPIC® RNA Protective Agent (YALI#YX27007) 可有效抑制 RNA 在保存过程中的降解, $2 \sim 8^{\circ}C$ 保存 14 天或 $-20^{\circ}C$ 下保存 1 年。

4. RT-PCR 反应失败问题排查

- 1) 应首先检查反应体系, 确保 PCR 以及逆转录反应体系无误。
- 2) 排查 RNA 是否降解。取少量新鲜提取或冻存的 RNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检验完整性。以哺乳动物细胞/组织为例, 完整的总 RNA 在胶上能看见清晰的三条带, 分子量从大到小分别为 28 S, 18 S, 5.8 S。若能看见三条带, 但带型模糊或弥散, 则说明 RNA 有部分降解, 建议立即进行逆转录反应, 并适量增大模板量。若只能看见分子量很小的一条带或没有条带, 则说明 RNA 已完全降解, 需要重新提取。
- 3) 排查 RNA 是否有盐离子等污染。Tryzol 提取 RNA 主要的杂质来自于异硫氰酸胍等盐的残留, 对后续酶反应可能存在影响, 因此需要用 70% 乙醇 (用 RNase-free ddH₂O 配制) 重复洗涤沉淀 (轻弹管底让沉淀悬浮, 静置 5 min), 去除异硫氰酸胍等盐的残留。