

YALEPIC[®] Tryzol Plus 提取试剂盒 (不含 DNase I) YALEPIC[®] Tryzol Plus Reagent (No DNase I)

产品货号

YR23014; (试) YR23014

产品保存及运输条件

常温运输, 2 ~ 8°C 避光保存。

产品概述

YALEPIC[®] Tryzol Plus Reagent (No DNase I) 基于异硫氰酸胍裂解技术, 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。样品在 Tryzol 中能够充分裂解保证 RNA 的完整性。加入 TryCOM 后溶液分成上层无色水相、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。几乎无蛋白和 DNA 污染。提取的 RNA 可用于 RT-PCR、Real-Time PCR、Northern Blot 等多种下游实验。

产品组分

序号	产品组分	YR23014	(试) YR23014
①	YALEPIC [®] Tryzol Reagent	100 ml	10 ml
②	YALEPIC [®] TryCOM Reagent	20 ml	2 ml
③	YALEPIC [®] RNA Dissolve Solution	15 ml	1.5 ml

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

异丙醇; 75%乙醇(RNase-free H₂O 配制) ; 1.5 ml RNase-free 离心管/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。
2. 使用 Nuclease-free 的移液器吸头和消耗品, 配制溶液应使用 RNase-free H₂O, 试剂使用完后立即盖好瓶盖, 避免交叉污染的风险。
3. 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, 如果不小心接触到眼睛, 应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。
4. 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。
5. 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。
6. 样品用 **Tryzol** 匀浆后, 如不即刻加入 **TryCOM**, 可于 -70°C 下放置一个月以上。
7. 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。
8. 如需单独除去 DNA, 建议选用无 RNase 的 **DNase I (YALI #YX27002)** 进行处理。
9. 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 -80°C 保存。

实验流程

● 样品处理

1. 动物组织: 取新鲜组织或 -70°C 冻存的组织尽量剪碎, 每 50 mg 组织加入 1 ml **Tryzol**, 用电动匀浆器进行冰上进行匀浆, 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。
(注: 样品体积一般不要超过 **Tryzol** 体积的 10%; 匀浆完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: 取新鲜植幼嫩的植物叶片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 50 mg 组织加入 1 ml **Tryzol**, 混匀。(注: 样品体积不超过总体积的 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 ≤ 1 × 10⁷, 收集前应除尽细胞培养液, 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 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, (沉淀中含细胞外膜、多糖和高分子量的 DNA) , **RNA 在上清中。** (注: 处理脂肪组织时上层有大量油脂应去除, 取澄清的匀浆液进行下一步操作)

● RNA 提取

1. 样品加入 **Tryzol** 充分裂解后, 室温放置 5min, 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 μl)** 至一个新的 RNase-free 离心管中。 (注: 吸取略少于 600 μl, 不要吸的太彻底, 以防吸到中间层导致基因组污染。吸取液体的体积约为使用 **Tryzol** 体积的 60%)
4. 在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇 (自备) , 颠倒混匀, 室温放置 10 min。
5. 4°C 12,000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 保留管侧及底部沉淀。
6. 加入 1 : 1 体积的 75% 乙醇 (自备, RNase-free H₂O 配制) 洗涤沉淀 (每使用 1 ml **Tryzol** 加入 1 ml 75%乙醇对沉淀进行洗涤) 。
7. 4°C 12,000 rpm 离心 3 min, 小心吸弃上清 (注: 剩余少量液体后瞬时离心, 吸弃上清, 不要吸到沉淀)
8. 室温放置 2 ~ 3 min, 晾干。加入 30 ~ 100 μl **YALEPIC® RNA Dissolve Solution**, 用移液器轻轻吹打几下, 充分溶解 RNA 后保存在 -70°C, 防止降解。 (注: 沉淀晾干不要超过 5 min, 以免难溶解)

产物检测

1. 纯度检测: 产物纯度用分光光度计检测, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8 ~ 2.2 之间表明 RNA 纯度较高。
2. 浓度检测: 产物浓度可以采用分光光度计检测, RNA 浓度 (ng/μl) = OD₂₆₀ × 稀释倍数 × 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 产物的 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 -80°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 RNA Storage Reagent (YALI #YS21071), 室温可存放一周, $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 存放一个月, -20°C (或 -80°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 ($2 \sim 8^{\circ}\text{C}$) 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 -70°C 长期保存, 在 -20°C 仅可短期保存。

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 28S, 18S, 5.8S。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 75% 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。