

TRIzol Reagent 总 RNA 提取试剂

产品描述

TRIzol Reagent 是一种即用型且操作迅捷的总 RNA 抽提试剂, 适用样本广泛, 包括人、动物、植物、酵母或细菌来源的细胞和组织样本。TRIzol Reagent 是一种含酚、异硫氰酸胍和其他专利成分的单相溶液, 有利于抽提分子量大小不一的各种 RNA 类型。TRIzol Reagent 能够良好的维持 RNA 完整性, 因能高效抑制样本匀浆过程中细胞破损和细胞组分溶解时释放的 RNase 活性。TRIzol Reagent 能够同时处理大量样本, 且以优化的方式一步法提取 RNA, 整个过程可在一小时内完成。

TRIzol Reagent 分离的总 RNA 无蛋白质和 DNA 污染, 适用于 RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot、poly(A)+ 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等下游实验。

保存与运输方法

保存: 2-8℃保存, 至少一年有效。

运输: 冰袋运输。

注意事项

- 1) 所有离心管、枪头以及相关溶液都必须无 RNase 污染。对于塑料制品、玻璃和金属器皿、实验仪器等可使用固相 RNase 清除剂去除 RNase, 或者用含 0.01% DEPC 的去离子水浸泡过夜, 之后高压灭菌、烘干。对于实验溶液可使用液相 RNase 清除剂来处理或用 DEPC 处理水来配制。
- 2) 对新鲜组织或细胞样本的抽提效果通常优于冻存的组织或细胞, 由于组织或细胞冻融过程中可能存在一些 RNase 释放出来并酶切样品。若是不能及时提取 RNA, 推荐先加入适量 TRIzol Reagent, 之后裂解样品后再冻存。
- 3) TRIzol Reagent 含有毒物质, 请在操作过程中注意好防护工作, 戴好手套和护眼罩, 避免皮肤接触。在通风橱内完成操作, 避免呼吸道吸入。
- 4) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用方法

1. 需要自行准备的材料

水浴锅或微量恒温仪 (Heat block)

异丙醇

75%乙醇

含 0.5% SDS 的 RNase-free 水或 RNase-free 水或 DEPC 处理水

【可选】RNase-free 的糖原 (核酸助沉剂)

2. 样本要求

【重要】：样本收集后立即进行 RNA 分离，或样本收集后立即冻存样本并保存在-80℃或液氮中直至 RNA 提取。

样本类型	每 mlTRIzol Reagent 处理的起始样本量
组织（新鲜组织或保存在 RNAlater 等稳定液内的组织）	50~100mg 组织
单层生长的细胞	$1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 单细胞层（35mm 培养皿，10cm ² ）
悬浮生长的细胞	5- 10×10^6 个细胞（动植物或酵母来源）或 1×10^7 个细胞（细菌来源）

3. 样本准备与分相

3.1 根据起始材料用 TRIzol Reagent 裂解和匀浆样本。

◇组织样本

按比例每 50~100mg 组织加 1ml TRIzol Reagent，之后用合适的方法进行匀浆。通常用 50~100mg 组织即可获得足量的 RNA，满足绝大多数下游实验。加入过量组织或过少 TRIzol 都容易导致 RNA 提取失败。

a) 对于研钵研磨：将液氮冻存组织，放到研钵中研磨成粉末，之后加入 1ml TRIzol，继续研磨至组织完全裂解【研磨要迅速，最好不要超过 1min】。

b) 对于玻璃匀浆器匀浆：加入 1ml TRIzol 上下手动匀浆组织 10~15 次。

c) 对于机械匀浆器：将组织放入塑料管内，将塑料管置于冰浴烧杯内，加入 1ml TRIzol，将分散器头垂直插入管内与组织直接接触，设置转速 12,000~20,000 rpm，上下移动试管 10~20 次，直至组织完全打散，无明显可见大块即可。

◇单层生长的细胞

吸尽培养基，之后往 35mm 培养皿（10cm²）内加入 1ml TRIzol Reagent，晃动 3~5 次，再用移液枪上下吹打 3~5 次，使其充分裂解。【按照 10cm² 培养面积加入 1ml TRIzol 加量。比如：六孔板每孔加入 1ml TRIzol，12 孔板每孔加 0.5ml TRIzol】

◇悬浮生长的细胞

离心收集细胞，吸尽上清，每 5- 10×10^6 个细胞（动植物或酵母来源）或 1×10^7 个细胞（细菌来源）加入 1ml TRIzol Reagent【加入 TRIzol 前不要清洗细胞，否则会增加 mRNA 降解的可能性】。用枪吹打几次或适当涡旋，使其充分裂解。某些酵母和细菌如裂解不充分，可用匀浆器匀浆，使其完全裂解。

【注意】：样本体积不要超过加入 TRIzol 体积的 10%。

3.2 特殊样本处理【可选】：对于某些富含蛋白，多糖或脂肪的样本，经 TRIzol Reagent 裂解后可能会有不溶物或油脂状漂浮物出现。此时需 12,000g 4℃离心 10min，之后吸取澄清的上清液至一新的离心管中。

3.3 室温孵育 5min，使得核蛋白体完全分解。

3.4 按照每 1ml TRIzol Reagent 加入 0.2ml 氯仿，盖紧盖子。涡旋混匀或用手剧烈晃动 15s，室温孵育 2~3min。

3.5 于 12,000g 4℃离心 15min。离心后混合物分为三层：下层酚-氯仿层，中间层，和上层无色的水相层。RNA 无一例外的停留在水相层中。水相层的容量约为所加 TRIzol Reagent 体积的 60%。用枪吸取上层无色水相到一新的离心管中，避免吸到任何中间层或下层成分。

【注意】：如果希望分离 DNA 和蛋白，请保留中间层和有机层。

4. RNA 分离

4.1 RNA 的沉淀：

a) **【可选】**如果起始样本量比较少（ $< 10^6$ 个细胞或 $< 10\text{mg}$ 组织），加入 5-10 μg RNase-free 的糖原作为核酸助沉剂到水相中。

b) 按每 ml 起初 TRIzol Reagent 加入 0.5ml 异丙醇，颠倒数次混匀，室温沉淀 10min。如果希望提取 microRNA 等小 RNA，推荐-70℃沉淀过夜。**c)** 于 12,000g 4℃离心 10min，在管底可见 RNA 沉淀，弃上清。

4.2 RNA 的清洗：

a) 按每 ml 起初 TRIzol Reagent 加入 1ml 75%乙醇重悬沉淀。**【注：RNA 在 75%乙醇中-20℃至少保存 1 年，4℃至少 1 周】**；

b) 低速涡涡或颠倒混匀，于 7,500g 4℃离心 5min，弃上清。再用离心机甩一下 ($>5,000\text{rpm}$ ，离心 1 秒)，小心吸尽液体。

c) 操作的最后，简单干燥 RNA 沉淀（空气干燥或真空干燥 5~10min）。不要在真空管里离心干燥 RNA。尤为重要的是，不能让 RNA 沉淀完全干燥，否则会极大的降低其可溶性。部分溶解的 RNA 样本的 A260/A280 比值 < 1.6 。

4.3 RNA 的溶解：用 20~50 μl 无 RNases 水或含 0.5% SDS 的无 RNases 水溶解 RNA，用枪上下吹打 2~3 次，使其充分溶解，置于-70℃保存或直接用于后续实验，如果后续要做酶切反应请勿用 SDS。

【注意】：对于肝脏、胰腺、肾脏等 RNase 含量较高的组织，沉淀可用 100%去离子甲酰胺溶解。

5. RNA 产量的测定

5.1 用无 RNase 水稀释 RNA，之后测定在 260nm 和 280nm 的吸收值。

5.2 使用公式 $A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 = \mu\text{g RNA/ml}$ 。

5.3 计算 A260/A280 比值，比值在 1.8~2.0 之间视为纯度较高，浓度 $> 4 \mu\text{g/ml}$ 的样品适用于分光光度计测定。

5.4 进行甲醛变性琼脂糖电泳，确定 RNA 的完整性和污染情况。