



TRIZOL Reagent 总 RNA 提取试剂

储存事项:

TRIZOL 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℃ 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:

TRIZOL 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($\geq 1g$)和细胞($> 10^7$)均有较好的分离效果。样品在 TRIZOL 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。

TRIZOL 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 TRIZOL 匀浆后,如果不即刻加入氯仿之前,置于-70℃下可放置一个月以上。保存在 75%乙醇中的 RNA 沉淀,2-8℃可以保存一周,-20℃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 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。

RNA 抽提操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

提示:用 TRIZOL 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℃ 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 TRIZOL 中迅速研磨,每



50-100mg组织加入1ml TRIZOL, 混匀。注意: 样品体积一般不要超过TRIZOL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 TRIZOL, 匀浆仪进行匀浆处理。或在液氮中研磨后加入TRIZOL 1ml混匀。注意: 样品体积一般不要超过TRIZOL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TRIZOL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TRIZOL 量(每10cm²加1ml)。当TRIZOL 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TRIZOL试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每5~10×10⁶的动物细胞, 植物或酵母菌细胞或每1×10⁷细菌加1ml的TRIZOL。在加入TRIZOL 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。

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℃ 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 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℃ 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 TRIZOL 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℃ 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 TRIZOL 用 1 ml 75%乙醇对沉淀进行洗涤。

9. 在室温或者 4℃ 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。