

Trizol总RNA提取试剂

KR009-1 100ml

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KR009-1
Trizol	(4°C避光)	100ml
RNase-free H ₂ O	室温	20ml

请于 2-8 度储存, 有效期 3 年。室温储存, 有效期 1 年

产品介绍:

Trizol 是广谱型总 RNA 提取试剂。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。

注意事项

1. 样品用 Trizol 匀浆后, 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, $2-8^{\circ}\text{C}$ 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 对 RNA 进行处理。
3. 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)。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

⇒ **Trizol 含有苯酚, 具有毒性和腐蚀性, 抽提 RNA 时要戴手套和护眼镜。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Trizol中迅速研磨，每50-100mg组织加入1mlTrizol，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°C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°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 Trizol 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 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°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 Trizol 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 30-100 μ l RNase free water, 充分溶解 RNA, 得到的 RNA 保存在-70°C, 防止降解。**注意：沉淀不要过分干燥，以免难于溶解。**