

## 免氯仿Trizol总RNA提取试剂

KR009-2 100ml

### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KR009-2
Trizol	(4°C避光)	100ml
RNase-free H <sub>2</sub> 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:

免氯仿 Trizol 是传统 Trizol 的免氯仿升级版, 广泛适用于从各类动物组织、植物材料、培养细胞、细菌等样品中提取 Total RNA 和 Small RNA。与传统 Trizol 提取方法相比, 本产品不需要使用氯仿进行分层, 操作更简单, 且全程可在常温进行。本产品提取的 RNA 基本不残留 DNA, 提取的 RNA 可以直接用于 cDNA 克隆、qRT-PCR 检测、mRNA 纯化、体外翻译、Northern blotting 杂交、高通量测序等各种分子生物学实验。

### 注意事项

1. 自备试剂: 异丙醇 (新开封或提取 RNA 专用)、75%乙醇(用 RNase free H<sub>2</sub>O 配制)
2. RNA 最重要的指标就是没有降解完整性高, 目前普通的分光光度计包括 Nanodrop 是无法通过测量 OD260/280 和 OD260/230 来确认 RNA 是否降解的。判断 RNA 是否降解可以通过跑 1%琼脂糖电泳检测通过直接观察 28S:18S 比值来判断是否降解, 或者用采用安捷伦 Bioanalyzer2100 仪器检测, 测定 RNA 产物的 RIN 值。
3. 免氯仿 Trizol 与传统 Trizol 一样属于通用型总 RNA 提取试剂, 具有和 Trizol 类似的适用范围。绝大部分常规动物组织细胞(如: 肝脏、肾脏、脑组织、培养细胞)、简单植物组织(如水稻、玉米、拟南芥、烟草、小麦等)都有良好效果。但是对于多糖多酚植物如棉花, 某些难破壁的细菌等样品不适用。

**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°C 的室温条件下。**

## 1. 样本处理

- 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25 - 50 mg组织加入0.5 ml Trizol, 混匀。
- b. 动物组织: 取新鲜或-70°C冻存动物组织尽量剪碎, 每15 - 50 mg组织加入0.5 ml Trizol, 匀浆仪进行匀浆处理。或在液氮中研磨后加入0.5 ml Trizol 混匀。
- 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0.5ml 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10 cm<sup>2</sup>加0.5 ml)。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1 - 5×10<sup>6</sup> 的动物细胞, 植物细胞或每5×10<sup>6</sup>细菌加0.5 ml 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。破裂某些细菌可能需要使用匀浆器。
  - e. 液体样本: 每200μl (低于200μl时, 可用RNase-free H<sub>2</sub>O补足) 血浆、血清等液体样本, 加入0.5ml Trizol 后振荡混匀。
2. 向上述裂解液中加入 2/5 体积的 RNase-free H<sub>2</sub>O(每 500μl Trizol 加 200μl 水), 剧烈振荡混匀, 室温静置 5min。当处理样本量较大 50mg 左右时, 可延长室温静置时间到 10 - 15 min。
  3. 室温 12,000 rpm 离心 15 min。
  4. 离心后溶液分成上层水相(含 RNA)和下层沉淀(含蛋白质、DNA、多糖等杂质), 小心吸取上层水相至一个新的离心管中。上层水相约占总体积的 90%, 如用 500μl Trizol 进行提取, 上层水相约为 630μl, 建

议吸取 500 $\mu$ l; 提取微量样本时, 为减少 RNA 损失, 可以全部转移上清。当样本量较小时, 离心后可能不会出现下层沉淀, 属于正常现象, 可继续按后续步骤完成提取。

5. 加入等体积异丙醇, 颠倒混匀, 室温静置 10 min。
6. 室温 12,000 rpm 离心 10min。通常可以看见白色沉淀, 小心弃去上清。RNA 沉淀在离心前通常不可见, 离心后在管侧壁和管底形成薄片状沉淀 (样品量少的情况下, RNA 沉淀散在管侧壁和管底有可能看不到明显沉淀)。部分组织材料由于含有较多的代谢产物, 导致沉淀不能聚集而分散在离心管壁上, 此时, 请沿液面缓慢吸取上清。
7. 加入 1ml 75%乙醇(RNase-free ddH<sub>2</sub>O)漂洗, 涡旋震荡 15 sec, 让沉淀悬浮起来, 并上下颠倒数次。
8. 室温 12,000 rpm 离心 3 min, 小心弃上清。
9. 重复步骤 7 和 8 漂洗一遍, 小心弃尽上清。为减少杂质残留, 应尽可能的将上清弃干净。建议弃去大部分上清后, 短暂点甩离心将残留液体甩至管底, 用 200 $\mu$ l 吸头吸尽残留的液体, 保留管底及管侧壁的白色 RNA 沉淀。
10. 室温晾干约 1min, 加入适量约 50 -100 $\mu$ l RNase-free ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀, Flick 轻弹离心管底, 让水充分接触管底和管侧壁的沉淀帮助溶解 RNA (可用移液器反复吹打管底和管侧壁的沉淀帮助溶解), 使 RNA 沉淀充分溶解。提取的 RNA 产物可以分装后在 - 85 ~ - 65 $^{\circ}$ C 长期保存, 在 - 30 ~ - 15 $^{\circ}$ C 仅可短期保存。一般稍稍晾干 RNA 即可, 过度干燥会导致 RNA 难于溶解。从某些样本提取 RNA 时, RNA 沉淀并非完全聚集在离心管管底, 而是也以均匀的薄雾状沉淀吸附在管侧壁上。请注意仔细观察, 并用移液器吹打管底和沉淀所在的管侧壁充分溶解所有的 RNA。