

## Trizol(总 RNA 提取试剂)

### 产品简介:

Trizol 是一种新型的用于细胞或组织的总 RNA 提取试剂, Trizol 采用与 Invitrogen TRIzol 相似的原理和方法, 其颜色、抽提的方法和步骤与后者完全相同。Trizol 含酚和异硫氰酸胍等物质, 能迅速裂解细胞或组织并且灭活核酸酶, 保持RNA 的完整性。加入氯仿并离心后, 溶液形成上清层为水相(无色)、中间层、下层为有机相(红色); 上清层用异丙醇沉淀回收总 RNA, 中间层用乙醇沉淀回收 DNA, 下层用异丙醇沉淀回收蛋白。

Trizol 适用于从各种组织或细胞中快速分离总 RNA, 既可用于少量样品(50 ~ 100 mg 组织、 $5 \times 10^6$  细胞), 也可用于大量样品(>1g 组织/> $10^7$  细胞), 提取的总 RNA 质量高, 可用于 Northern blot、Dot blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆, 该试剂具有以下特点: ①适用范围广; ②操作简单, 整个过程1小时内完成; ③纯度高; ④污染少。该试剂仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成:

名称 \ 编号	ADS252R0	Storage
Trizol Reagent	100ml	4°C 避光
使用说明书	1 份	

### 自备材料:

- 1、试剂: 无水乙醇、氯仿、异丙醇、DEPC 处理水等。
- 2、耗材: RNase 广泛存在于人的皮肤上和体液及环境中, RNase 是导致 RNA 降解的最主要物质, 非常稳定。操作时应佩戴一次性口罩、手套、帽子。塑料制品、玻璃和金属物品、实验仪器等应清除 RNase, 移液器吸头、EP 管等制品的 RNase free 处理尤为重要。
- 3、仪器: 低温高速离心机、低温冰箱。

### 操作步骤(仅供参考):

#### 1、样品准备

##### (1)贴壁细胞:

①直接裂解: 直接在培养瓶/皿中加入 Trizol 裂解细胞, 每  $10\text{cm}^2$  面积加 1ml Trizol, 用移液器吹打混匀。

②胰蛋白酶消化：用无菌 PBS 洗涤细胞后，加入含有 0.05 ~ 0.25% 胰蛋白酶的 PBS 处理细胞，当细胞脱离容器壁后，加入含有血清的培养基终止反应，将细胞溶液转移至无 RNase 的离心管中，5000 ~ 6000g 离心 5 min，收集细胞沉淀，去除上清。收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净，否则裂解不完全，降低 RNA 收获率。

(2)悬浮细胞：无需清洗细胞，直接 5000 ~ 6000 g 离心 5 min，收集细胞，每  $5 \times 10^6 \sim 10^7$  动物、植物和酵母细胞或每  $10^7$  细菌细胞加入 1ml Trizol。

(3)组织：取新鲜动物或者植物组织或者 -70°C 冻存组织，50 ~ 100mg 组织在液氮中充分研磨或者加入 1ml Trizol 研磨或者用匀浆器匀浆处理。样品体积一般不超过 Trizol 体积的 10%，研磨要迅速，以 1min 为佳。

(4)血液：取 0.5 ~ 1 ml 新鲜或冻存的血液，12000g 离心 5 min，去除血浆，加入 1ml Trizol，充分振荡混匀。

2、核酸分离：充分振荡混匀(可以置于低温/超低温冰箱冻存 5 ~ 10 min 后，充分振荡，反复 1 ~ 3 次)，将裂解样品或匀浆液室温放置 5 ~ 10 min，使核蛋白与核酸完全分离。

3、样品分层：加入 0.2 ml 氯仿/1ml Trizol，剧烈振荡 15 s，室温放置 2 ~ 3 min，置于 4°C 离心机，12000 g 离心 10 ~ 15 min；上层为水相，中间层和下层为有机相，RNA 在上层水相。

4、沉淀 RNA：吸取上层水相(约 500 $\mu$ l)转移至无 RNase 的离心管中(不要吸取任何中间层物质，否则会有染色体 DNA 污染)，加入等体积异丙醇混匀(或者加入 1.2 倍体积 Trizol 专用 RNA 沉淀液，超低温冰箱放置 2 ~ 3hr, 可以大大提高 RNA 回收率)，室温放置 15 ~ 20 min，12000 g 4°C 离心 10 min，离心后管侧或管底形成胶状沉淀，弃上清。

5、洗涤 RNA：加入 1ml DEPC 水配制的 75%乙醇/1ml Trizol 洗涤沉淀(或者加入 1ml Trizol 专用 RNA 洗涤液，可以大大提高 RNA 纯度)，室温放置 5 ~ 10 min，7500g 4°C 离心 5 min，弃上清，室温干燥 5 ~ 10 min，不宜过分干燥，否则 RNA 难以溶解。

6、溶解 RNA：加入 30 ~ 50 $\mu$ l RNase-free ddH<sub>2</sub>O 充分溶解 RNA，-70°C 长期保存或直接用于后续试验。对于肝、胰腺、肾等组织中 RNase 含量高的样品，沉淀时用 100% 去离子甲酰胺溶解。

### 分析与定量：

1、测定样品在 260 nm 和 280 nm 的吸收值确定 RNA 的质量，按 1OD=40 $\mu$ g RNA 计算 RNA 的产率，OD<sub>260/280</sub> 在 1.8 ~ 2.0 视为抽提 RNA 纯度较好，浓度在 4 $\mu$ g/ml 以上的样品适于用分光光度计测定。

2、进行甲醛变性琼脂糖电泳，确定 RNA 的完整性和污染情况。

3、核酸分析仪测定 RNA 的质量和纯度。

### 注意事项:

- 1、样品保存: 加入 Trizol 混匀后, 样品可在-70℃放置 1~2 月; RNA 样品可以在 70%酒精中-70℃保存 2~4 周: 如果需要长期保存, 应置于超低温冰箱中保存。
- 2、Trizol 是强腐蚀性物质, 污染皮肤或眼睛后, 立即用清水或生理盐水冲洗, 必要时寻求医生的帮助。
- 3、Trizol 可常温运输, 建议保存 4℃保存。
- 4、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期:** 12 个月。常温运输, 4℃保存。

### 常见问题分析:

常见问题	可能原因
<b>A<sub>260</sub>/ A<sub>280</sub> &lt; 1.6</b>	抽提得到的 RNA 沉淀未完全溶解。
	水相中混有有机相, 从而存在蛋白质和 DNA 污染。
	RNA 样品用水而不是 TE 溶解。低离子浓度和低 pH 条件下, A <sub>280</sub> 值会偏高。
	样品匀浆时加的 Trizol 试剂太少, RNA 与蛋白质、DNA 未能完全分离。
	匀浆后样品未在室温放置或者放置时间太短, RNA 与核蛋白未完全解离。
<b>DNA 污染</b>	样品中含组织溶剂(如乙醇等)或碱性溶液, 致水相减少或 pH 升高。
	样品匀浆时加入的试剂体积太少。如果存在 DNA 污染, 可用 DNA 清除剂去除。
	水相中混有有机相, 从而存在蛋白质和 DNA 污染。
<b>RNA 产量低</b>	样品裂解或匀浆处理不彻底, RNA 没有被完全释放出来。
	得到的 RNA 沉淀未完全溶解。
	抽提的 RNA 中含有 RNase。
<b>RNA 降解</b>	组织或细胞不新鲜, 样品没有及时被液氮冻存, 导致组织或细胞中的 RNA 降解。
	溶液或离心管未经 RNase free 处理, RNase 的污染导致 RNA 被降解。
	细胞在胰蛋白酶消化时间过长, 导致未加 Trizol 前 RNA 已经部分降解。
	电泳时使用的甲酰胺 pH 小于 3.5, 导致 RNA 发生酸解。
<b>蛋白和多糖污染</b>	水相中混有有机相, 从而带有蛋白质和 DNA。
	样品中蛋白、多糖含量高或样品量太大, 细胞未裂解完全。