

## 组织细胞RNA提取试剂盒(Trizol提取法)

### 产品简介

RNA的种类来源比较多，提取制备的方法各异，一般有苯酚法、去污剂法和盐酸胍法，其中最常用的是苯酚法，即Trizol法提取RNA，Trizol含苯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，溶液形成上层为水相(无色)、中间层、下层为有机相(红色)，上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。

组织细胞RNA提取试剂盒(Trizol提取法)适用于从各种组织或细胞中快速分离总RNA，既可用于小量样品(50~100mg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，该试剂盒有以下特点：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。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成

名称 \ 编号	ADS050NEO 50T	Storage
试剂(A):Trizol Reagent	50ml	4°C避光
试剂(B):RNA 分离液	10ml	RT 避光
试剂(C):RNA 沉淀液	50ml	RT
试剂(D):RNA 洗涤液	50ml	RT
试剂(E):RNase-free ddH <sub>2</sub> O	10ml	RT
试剂(F):RNA 保存液	10ml	RT 避光
使用说明书	1份	

### 自备材料

- 液氮、研钵或匀浆器
- 经RNase free处理的移液器吸头、EP管等耗材
- 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 Reagent裂解细胞，每10cm<sup>2</sup>面积加1ml，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，以下参考悬浮细胞相关操作步骤。

2) 悬浮细胞：无需清洗细胞，直接5000 ~ 6000g离心5min，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，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 Reagent，充分振荡混匀。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 Reagent研磨或者用匀浆器匀浆处理，样品体积一般不超过Trizol Reagent体积的10%，研磨要迅速，以1min为佳。

4) 血液：取0.5 ~ 1ml新鲜或冻存的血液，12000g离心5min，去除血浆，加入1ml Trizol Reagent，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 ~ 10min后，充分振荡，反复1 ~ 3次)，将裂解样品或匀浆液室温静置5 ~ 10min，使核蛋白与核酸完全分离。

3、样品分层：加入0.2ml RNA分离液，振荡15s，室温静置2 ~ 3min，12000g 4°C离心10 ~ 15min，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RNA沉淀液混匀，室温放置15 ~ 20min，12000g 4°C离心10min，离心后管侧或管底形成胶状沉淀，弃上清。

5、洗涤RNA：加入1ml RNA洗涤液轻轻洗涤沉淀，室温放置5 ~ 10min，7500g 4°C离心5min，弃上清，室温干燥5 ~ 10min，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，-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含量高的样品沉淀用RNA保存液溶解。

## 注意事项

1、样品保存：加入Trizol Reagent混匀后，样品可在-70°C放置1 ~ 2月；RNA样品可以在70%酒精中-70°C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 Reagent和RNA分离液含有腐蚀性物质，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、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，按要求保存。

## 分析与定量

- 1、测定样品在260nm和280nm的吸收值确定RNA的质量，按1OD=40pgRNA计算RNA的产率，OD260/OD280在1.8~2.0视为抽提RNA纯度较好，浓度在4μg/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。

#### 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。