

Trizol (总 RNA 提取试剂)

T669996

产品信息:

T669996	组成部分	100 ml	存储
T669996A	TRzol	100 ml	2-8℃.
T669996B	氯仿替代物	10 ml	2-8℃. 避光储存。

储存条件:

2-8℃. 避光储存.

重要提示:

有毒物接触皮肤或者不慎吞服, 会导致灼伤。一旦接触皮肤后立即以大量的洗涤剂和清水清洗。若感不适, 看医生并寻求苯酚和其他成分的正确治疗方案。

产品介绍:

TRzol 试剂是直接从细胞或组织中提取总 RNA 的试剂。它在破碎和裂解细胞时能保持 RNA 的完整性。加入氯仿替代物/氯仿后离心, 样品分成水样层、中间层和有机层。RNA 存在于水样层中。收集上面的水样层后, RNA 可以通过异丙醇沉淀来回收。

无论是人、动物、植物还是细菌, 该方法对少量及大量的组织和细胞均有较好的分离效果。TRzol 试剂操作上的简单性允许同时处理多个样品。所有的操作可以在一小时内完成。TRzol 抽提的总 RNA 能够避免 DNA 和蛋白的污染, 可用于 RNA 印迹分析、斑点杂交、poly(A)+筛选、体外翻译、RNA 酶保护分析和分子克隆。如果是用于 PCR, 当两条引物位于单一外显子内时, 建议用扩增级的 DNase I 来处理抽提的总 RNA。

TRzol 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 经琼脂糖凝胶电泳并用溴化乙啶染色, 可见许多介于 7kb 和 15kb 之间不连续的高分子量条带(mRNA 和 hnRNA 成分), 两条优势核糖体的分子量约在 5 kb (28S)和 2 kb(18S), 低分子量 RNA 介于 0.1 和 0.3kb 之间 (tRNA, 5S)。当抽提的 RNA 用 TE 稀释时其 A_{260}/A_{280} 比值 ≥ 1.8 。

注意事项:

1.从少量的组织(1~10mg)或细胞(102-104 个)中分离 RNA 样品: 往组织或细胞中加入 800 μ l TRzol。待样品裂解后, 加入氯仿替代物并进行步骤 2 中的抽提操作。在用异丙醇沉淀 RNA 之前, 加入 5~10 μ g 无 RNA 酶的 glycogen 作为水样层的载体。为降低其黏度在加入氯仿前用 26 号注射器抽吸两次以切断基因组 DNA。Glycogen 会留在水样层中并和 RNA 共析出。在浓缩到 4mg/ml 之前它不会抑制逆转录反应第一链的合成也不会抑制 PCR。

2.在匀浆化后和加入氯仿替代物之前, 样品可以在-60℃或者-70℃保存至少一个月。将 RNA 沉淀溶于 75%的乙醇在 2-8℃至少可以保存一周, 在-5- -20℃下至少可保存一年。

3.用 TRzol 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。如无例外, 室温保持在 15~30℃的条件下。

自备试剂:

异丙醇、75%乙醇(RNase-Free water 配制)、RNase-Free water (将水加入无 RNA 酶的玻璃瓶中, 加入 DEPC 至 0.1% (V/V)。放置过夜并高压灭菌)。

操作步骤:

1.样品预处理

a.植物组织: 以叶片 RNA 提取为例。取新鲜叶片在液氮中充分研磨或将叶片剪碎后直接在 TRzol 试剂中研磨, 研磨要迅速, 最好不要超过 1min。大约 100mg 叶片使用 1ml TRzol 试剂。

b.动物组织: 以鼠肝脏 RNA 提取为例。取新鲜或-70℃冻存组织, 每 30-50mg 组织加入 1ml TRzol 试剂, 用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积一般不要超过 TRzol 试剂体积的 10%。

c.单层生长的细胞: 直接往直径 3.5 cm 的培养板中加入 1ml 的 TRzol 裂解细胞, 通过移液管分次移出细胞裂解物。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的 TRzol 量 (每 10cm² 加 1ml)。当 TRzol 量不足时可导致抽提的 RNA 中污染有 DNA。

d.悬浮生长的细胞: 通过离心来沉淀细胞。在 TRzol 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 TRzol。在加入 TRzol 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.分离阶段

将匀浆样品在 15 -30℃ 条件下孵育 5 min 以使核蛋白体完全分解。(可选步骤: 4℃ 12,000rpm(~13,400×g) 离心 10min, 取上清。注意: 如果样品中含有较多蛋白、脂肪、多糖或肌肉、植物结节部分等, 可离心去除。离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量 DNA, 上清中含有 RNA。处理脂肪组织样品时, 上层是大量油脂, 应除去。取澄清的匀浆溶液进行下一步操作。)

每 1ml TRzol 加 0.1ml 氯仿替代物。盖紧样品管盖, 用手用力摇晃试管 15 秒并将其在室温下孵育 2-3 min。4℃ 12,000rpm(~13,400×g)离心 15 min。离心后混合物分成三层: 下层有机层, 中间层, 上层无色的水样层。RNA 存在于上层水样层当中。水样层的容量大约为所加 TRzol 容量的 60%。

3.RNA 的沉淀

将水样层转移到新的离心管中, 如果希望分离 DNA 和蛋白, 有机层和中间层同样要予以保留。通过将水样层和异丙醇混合来沉淀 RNA。

每 1ml TRzol 加入 0.5ml 异丙醇, 混匀。将混合的样品在 15 -30℃ 条件下孵育 10min, 4℃ 12,000rpm(~13,400×g)离心 15 min。RNA 沉淀在离心前通常不可见, 离心后形成一胶状片状沉淀附着于试管壁和管底。

4.RNA 的漂洗

移去上层悬液。用 75%的乙醇(RNase-Free water 配制)洗涤 RNA 沉淀 1-2 次, 每 1ml 的 TRzol 至少加 1ml 的 75%乙醇。旋涡振荡混合样品并在 2~8℃下以不超过 7,500×g 的离心力高速冷冻离心 5 min。

5.RNA 的再溶解

室温干燥 RNA 沉淀, 不要在真空管里离心干燥 RNA。尤为重要, 不能让 RNA 沉淀完全干燥那样会极大地降低它的可溶性。部分溶解的 RNA 样品其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值 <1.6。用移液管分几次移取 RNase-Free water 来溶解 RNA, 溶解后保存在-70℃。