

总 RNA 提取试剂(Trizol)

T751379

产品简介:

Trizol 是细胞或组织总 RNA 抽提试剂。本产品采用和 Invitrogen 公司的 TRIzol 完全相似的原理和方法,抽提的方法和步骤完全相同。

Trizol 的颜色和 TRIzol 相同,加入氯仿后上层呈无色,下层呈红色,便于吸取上层水相。

Trizol 对动植物细胞或组织及细菌的总 RNA 抽提均适用。

Trizol 抽提所得 RNA 无 DNA 和蛋白污染。一般所得 RNA 溶于 DEPC 水后的 A260/280 值为 1.8-2.0。

裂解细胞或和组织共匀浆时,Trizol 可以保持样品中 RNA 的完整性,即可以有效抑制 RNA 的降解。

每 1×10^6 细胞用 Trizol 抽提可得 5~15 μ g RNA;每 mg 组织用 Trizol 抽提可得 1~10 μ g RNA。产量因细胞和组织不同而异。

Trizol 抽提所得 RNA 可直接用于 Northern,点杂交,纯化 mRNA,体外翻译, RNase protection assay, cDNA 克隆,以及 RTPCR;也可以用于基因表达芯片分析、高通量测序等对 RNA 质量要求较高的情况。

保存条件:

室温保存,一年内有效。

操作流程:

1 样品均浆

1.1 确定样品的种类,在室温下,根据下表进行均浆。样品的体积不能超过 Trizol 的 10%。必须确保使用足够量的 Trizol,因为不足量的 Trizol,会导致 DNA 污染 RNA。

样品类型	流程
组织	1.50~100mg 组织+1mLTrizol;2.使用均浆器均浆样品。 注意:收集样品后,立即进行实验,或立即冻存。
贴壁细胞	1.去除培养基 2.在每 10cm ² 的培养皿中加入 1mLTrizol;注意:在 35mm 培养皿中加入 1mL Trziol,在 60mm 培养皿中加入 3mL Trziol,在 100mm 培养皿中加入 8mL Trziol,与细胞数无关;3.在培养皿中用吸头反复吹打裂解细胞。
悬浮细胞	1.离心收集细胞后,去除培养基;2.在 0.25mL 样品(5~10x10 ⁶ Cells,动物、植物或酵母,或者 10x10 ⁷ 细菌细胞)中加入 0.75mL Trizol;注意:加入 Trizol

	之前不要洗涤细胞，避免增加 mRNA 降解的可能性;3.反复吹打裂解细胞，酵母与细菌细胞需要均浆。
--	---

1.2(可选择)当含大量脂肪、蛋白、多糖或细胞外基质(例如，肌肉、脂肪或植物的块胶组织)的样品制备 RNA 时，需增加离心步骤，从样品中去除不溶解的物质。

注意:如果进行 DNA 分离，不要离心。

样品类型	注意
高脂肪、蛋白、多糖或细胞外基质的组织或细胞	1.均浆后，4°C 下，12,000g 离心 10min;注意:沉淀中含细胞外基质、多糖及高分子 DNA,而上清液中含 RNA。在高脂肪样品中，上清液的上层为脂肪层; 2.去除脂肪层; 3.将上清液转移至新的试管中。

2 相分离:

2.1 在室温下，将均浆液孵育 5min,允许核蛋白复合体分离;

2.2 在每 1mLTrizol 制备的均浆液中加入 0.1mL 分相试剂 BCP 或者氯仿。盖紧盖子;

2.3 剧烈震荡试管 15sec;

2.4 在室温下孵育 2~3min;

2.5 在 4°C 下，12,000g 离心 15min;

注意:裂解液分为红色的苯酚-BCP 层(氯仿层)，中间层，无色的水相。RNA 完全保留于水相中。上层的水相大约为总体积的 50%;

2.6 将试管倾斜 45°，小心吸出上层溶液，不要扰动中间层及苯酚层;

2.7 将上层溶液转移至新的试管中;

3RNA 沉淀

使用恰当预防措施避免 RNase 污染。

3.1(可选择)当从小量样品(<10 细胞或<10mg 组织)中沉淀 RNA 时，应在水相中加入 5~10µg 无 RNase 酶的糖原(glycogen);

注意:糖原(glycogen)与 RNA 共沉淀，当其浓度≤4mg/mL 时，不抑制第一链的合成，不抑制 PCR 反应。

3.2 在每 1mLTrizol 均浆后，所得到的水相中加入 0.5mL 异丙醇;

3.3 在室温下孵育 10min;

3.4 在 4°C 下，12,000g 离心 10min;

注意:在离心前，RNA 是不可见的，离心后，在试管底部及侧壁形成胶样沉淀。

4RNA 洗涤

4.1 从试管中取出上清液，只剩下 RNA 沉淀;

4.2 用 1mL75%乙醇洗涤沉淀(起始为 1mLTrizol 所得到的沉淀);

4.3 短暂涡旋, 然后在 4°C 下, 7500g 离心 5min,其上清;

4.4 在空气中干燥 RNA 沉淀 5~10min。不要真空离心干燥沉淀。

注意:不要让 RNA 沉淀完全干燥,因为会降低 RNA 溶解度。导致 RNA 的 A260/A280<1.6。
5RNA 重悬

5.1 用于溶解 RNA 的试管及溶液必须是无 RNase 酶的。用 DEPC 水重悬 RNA 沉淀, 不要使

RNA 干燥, 用吸头反复吹打。如果溶解于 DEPC 水,在室温下, 涡旋 RNA 沉淀 5~10min, 也可在 50~55°C 下孵育 10~15min。用 100 μ LDEPC 水溶解 100~400ugRNA 样品。反复吹打使 RNA 溶解, 在 50~55°C 下孵育 10~15min。

5.2 溶解的 RNA,应保存于-70°C。

注意事项:

1.如果需要测量 RNA 的 A260/A280 的比值, 建议使用 RNA 定量缓冲液对样品稀释后, 进行测量。

2.所有离心管,枪头及相关溶液都必须无 RNA 酶污染。耐高温器物可 180°C 烘烤 4 小时以去除 RNA 酶, 其它器物去除 RNA 酶可考虑用 0.01%的 DEPC 水浸泡过夜, 然后灭菌, 烘干。

溶液需用 DEPC 水配制。加 0.01%DEPC 至重蒸水或 MiliQ 级水中,处理过夜,灭菌即成 DEPC

3.使用冻存的细胞或组织抽提总 RNA 的效果通常比新鲜的细胞或组织差一些。因为在细胞或组织冻融过程中--些细胞或组织内的 RNase 会被释放出来并剪切样品。如果不能及时抽 RNA,推荐先加入适量 Trizol,并裂解样品后冻存。

4.必须戴一次性手套操作, 且尽量不要对着 RNA 样品呼气或说话, 以防 RNA 酶污染。建议戴一次性口罩操作。

5.Trizol 含有毒物质苯酚, 避免接触皮肤或吸入。为防止溅入眼睛, 请戴防护眼镜或使用透明保护屏。如皮肤接触 Trizol,请立即用大量去垢剂和水冲洗, 如仍有不适, 请听取医生意见。

温馨提示:

为了您的自身安全, 使用试剂前, 请做好防护, 如穿实验服, 带手套等。