

描述: TRIzol Reagent 是一种可提取动植物样品中 RNA 的制品。样品在 TRIzol Reagent 中能够充分被裂解, 在样品匀浆或裂解过程中, 它可保持 RNA 的完整性, 同时裂解细胞, 溶解细胞内含物。TRIzol Reagent 具有很强的广谱性, 可以适用于各种样品的总 RNA 提取, 提取过程方便快捷, 整个操作在一小时内便可以完成。该试剂可用于小量样品 (50-100 mg 组织、 1×10^7 细胞) 也适用于大量样品 (≥ 1 g 组织、 $>10^9$ 细胞)。对人、动物、植物组织均适用, 可同时处理大量不同样品, 整个提取过程在一小时内即可完成。分离的总 RNA 中蛋白质和 DNA 污染极低, 可用于 Northern Blot、反转录、NGS 建库等试验。

TRIzol LS Reagent 专用于液体样本的 RNA 提取, 与 TRIzol 相比, 唯一区别在于其组分浓度, TRIzol LS 是浓缩试剂, 允许加入更多体积的液体样本。因此其尤其适用于, 如病毒液、拭子液、灌洗液、抗凝全血、血清、血浆等液体样本。除此外, 组织样本采用钢珠研磨的组织悬液, 也适合采用该试剂来提取总 RNA。

储存: 2-8℃ 避光保存, 可保存两年。

注意: 该试剂含有强变性剂, 请勿直接于皮肤接触或吞咽, 若接触到皮肤或眼睛请尽快到医院处理。实验时务必穿实验服, 戴手套。

2 操作方法 (样本准备)

2.1 抗凝全血、血清、血浆、灌洗液、拭子液等液体样本: 吸取 200 μ l 到 1.5 ml EP 管中, 加入 0.8 ml 的 TRIzol LS, 旋涡混合 15s。

2.2 机械钢珠研磨的动植物组织样品: 取 100~200 mg 样品加入 400 μ l 的 ddH₂O, 研磨成浆液后 (不离心), 取 200 μ l 浆液放入到 1.5 ml EP 管中。加入 0.8 ml 的 TRIzol LS, 旋涡混合 15s。

2.3 培养细胞: 悬浮细胞, 或贴壁细胞用胰酶消化后的悬液, 取 200 μ l 悬液放入到 1.5 ml EP 管中。加入 0.8 ml 的 TRIzol LS, 旋涡混合 15s

3 操作方法 (分离提取)

3.1 上述裂解物, 室温静置 5min, 使核酸蛋白复合物完全分离。向裂解物中加入, 200~250 μ l 的氯仿或氯仿替代物 (货号: B0202)。旋涡混合 15s, 室温静置 2min。

3.2 将 1.5 ml EP 管置于离心机中, 13000rpm 离心 10min。此时溶液分层, 吸取 600 μ l 的上层无色上清液到新的 1.5 ml EP 管中, 并加入等体积 600 μ l 的异丙醇, 手腕用力上下颠倒数次, 于 -20℃ 放置 5min。

注意: 吸取上层无色液体时, 切勿吸入中间白色沉淀层, 否则会导致蛋白污染。

3.3 将 1.5 ml EP 管置于离心机中 13000rpm 离心 10min, 小心倒掉上清, 留取底部总 RNA 沉淀。向 RNA 沉淀中加入 1 ml 的 70%乙醇, 上下颠倒数次进行洗涤, 13000rpm 离心 5min, 小心倒掉上清, 留取底部 RNA 沉淀。再次加入 1ml 的 70%乙醇, 重复此洗涤步骤一次。

3.4 倒掉洗液, 再次短离心 10s 后, 用 10 μ l Tip 头吸干剩余的洗液, 置于室温使乙醇挥发干净 (~20min)。

3.5 加入 20~100 μ l TE Buffer 或 RNase Free H₂O 溶解沉淀 RNA。溶解的 RNA 冷冻保存。通常 RNA 的浓度为 0.1~2 μ g/ μ l, OD260/280 约 1.9~2.1。

4 常见问题分析

4.1 抽提率低。可能原因: (a. 样品裂解或匀浆处理不彻底; b. RNA 沉淀未完全溶解)

4.2 A260/A280<1.65。可能原因: (a. 检测吸光度时, RNA 样品没有溶于水, 而溶于了 TE 中; b. 样品匀浆时加的组织量过多; c. 分层后, 吸取上清液不足 500 μ l; d. 吸取水相时混入了有机相)

4.3 DNA 污染过多。可能原因: (a. 样品匀浆时加的试剂量太少或组织量过多; b. 样品中含有有机溶剂)