

TRIzol Total RNA Extraction Reagent

R201

Version 23.1.1



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

1

目录 Product Manual

产品简介	1
产品组成	1
储存条件	1
自备材料	1
注意事项	1
实验方案	2
常见问题与解决方案	5

产品简介

基于异硫氰酸胍和酚，具有极强的裂解能力，可在短时间内裂解细胞和组织样本，保证 RNA 的完整性。本产品广泛适用于培养细胞、动物组织、微生物，以及次生代谢较少的植物组织，如幼苗、幼叶等。样品在 RNA isolater 中能够充分被裂解，在加入氯仿离心后，溶液会形成上清层、中间层和有机层 (鲜红色下层)，RNA 分布在上层水相中，收集上清层后，经异丙醇沉淀便可以回收得到 Total RNA。

产品组成

组分	R201
TRIzol Total RNA Extraction Reagent	100 ml

储存条件

4℃避光保存

自备材料

氯仿，异丙醇，75%乙醇 (DEPC 水配制)，DEPC 水

注意事项

本产品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性，使用时应穿戴防护物品，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不慎接触到眼睛，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗；接触到皮肤，请立即用大量去垢剂和水冲洗，如仍有不适，请前往医院治疗。

实验方案

实验流程概览:



实验流程：

1. 细胞裂解或组织匀浆。

a. 贴壁细胞

吸尽培养液，每 10 cm² 细胞加入 1 ml TRIzol Total RNA Extraction Reagent。一般六孔板每孔加 1 ml TRIzol Total RNA Extraction Reagent，12 孔板每孔加 0.5 ml TRIzol Total RNA Extraction Reagent。晃动 3-5 下，再用枪吹打 2-3 下，确保全部裂解，然后吸至离心管中。

b. 悬浮细胞

离心收集细胞，吸尽液体，每 500 万 ~ 1000 万动植物或酵母细胞，或 1000 万细菌，加入 1 ml TRIzol Total RNA Extraction Reagent。用枪吹打或适当涡旋，确保全部裂解。某些酵母和细菌如裂解不充分，可用匀浆器匀浆，确保全部裂解。

c. 组织

先将组织剪切成小块，放入普通玻璃匀浆器内。每 50 mg-80 mg 组织加入 1 ml TRIzol Total RNA Extraction Reagent，匀浆。

对于 RNA 完整性要求比较高的情况，推荐先液氮冷冻组织块，然后在低温下用研钵研碎组织，随后加入 TRIzol Total RNA Extraction Reagent 进行总 RNA 抽提。

2. 对于某些蛋白，多糖或脂含量很高的细胞或组织，TRIzol Total RNA Extraction Reagent 裂解后可能会有不溶物或油脂状漂浮物，需 12,000 × g, 4°C 离心 10 min，接着吸取澄清的 TRIzol Total RNA Extraction Reagent 裂解产物至一新的离心管中。

3. 室温放置 5 min，使样品充分裂解。

4. 每 1 ml TRIzol Total RNA Extraction Reagent 加 0.2 ml 氯仿，用手剧烈震荡 15 sec，成乳浊液，4°C 静置 5 min。

5. 12,000 × g, 4°C 离心 15 min，吸取含总 RNA 的上层无色水相至一新的离心管中。

每 1 ml TRIzol Total RNA Extraction Reagent 约可吸取 0.5-0.55 ml。

6. 按每 1 ml 最初的 TRIzol Total RNA Extraction Reagent 加入 0.5 ml 异丙醇，颠倒数次混匀。4°C 静置 10 min。如果希望提取 microRNA 等小 RNA，推荐 -70°C 沉淀过夜。

7. 12,000 × g, 4°C 离心 10 min，在管底可见 RNA 沉淀，小心弃上清。

8. 每 1 ml 最初的 TRIzol Total RNA Extraction Reagent 加入 1 ml 75%乙醇 (DEPC 水配制)。充分洗涤管盖

和管壁，并轻弹管底，让沉淀悬浮起来，静置 3-5 min。

9. $12,000 \times g$, 4°C 离心 5 min, 弃去上清, $>5,000\text{rpm}$, 空离 1 sec, 小心吸尽液体。

10. 待 RNA 略干后, 加入 $20 \mu\text{l}$ DEPC 水溶解, -70°C 冻存。

切勿让 RNA 过分干燥, 否则将极难溶解, 且测出的 $A_{260}/280$ 值会低于 1.6。

11. 取 $1 \mu\text{l}$ RNA 至 $8 \mu\text{l}$ DEPC 水或 TE 中, 加入 $1 \mu\text{l}$ $10 \times$ DNA loading buffer, 混匀, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

若能看见清晰的三条带, 说明 RNA 完整性较好。

12. 用 DEPC 水或 TE 稀释 RNA, 检测 260 nm、280 nm 处 OD 值, 并计算 OD_{260}/OD_{280} 。

纯的 RNA 的比值在 1.8-2.2 之间。若小于 1.8, 可能有 DNA 或蛋白残留; 若小于 1.6, 可能 RNA 未溶解完全。 $\text{RNA 浓度 (ng}/\mu\text{l)} = OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40$ 。

常见问题与解决方案

❖ RNA 降解

如果使用者确定提取 RNA 的试剂/器具没有问题，RNA 的降解通常发生在样品破碎/匀浆阶段。RNA 提取实际上是一个将样本破碎匀浆，打破细胞结构，让 RNA 释放到一个液相体系中，再将其抽提出来的过程。样品离开活体或者原来的生长环境后，样品中的内源 RNase 开始降解 RNA，降解速度与内源 RNase 的含量及温度有关。

有两个方法可以彻底抑制内源 RNase 活性：

- 立即加入裂解液并且彻底、迅速地匀浆。这只适合培养细胞及内源 RNase 含量较低并且较容易匀浆的组织；
- 对于内源 RNase 含量高或不易匀浆的组织，如肝脏、胰腺、脾脏、肌肉等，或植物组织，需要切成小块后立即投入液氮冷冻，再按 06-3 中动物/植物组织的说明进行破碎/匀浆。样品彻底破碎匀浆后，RNA isolater 就可以与游离出来的 RNA 充分接触，保护 RNA 不受降解。特别注意，在整个研磨过程中，样品不得融化，因为冷冻过的样品内会形成冰晶，破坏细胞内部结构，使内源 RNase 更容易起作用。

❖ 组织样本应该如何保存？

如果不能立刻提取 RNA，应将组织离体后迅速投入液氮冷冻，并用液氮保存；或待冻结后，转移至-80℃保存。注意：不能直接将新鲜组织放在-80℃冷冻，否则样品的冻结会是一个缓慢的过程，在这个过程中内源 RNase 足以将 RNA 降解。也将新鲜组织充分浸泡在 ATG™ RNA Stabilization Solution (ATG #R202)中，可在室温存放一周，4℃存放一个月或-20℃/-80℃长期保存。

❖ 提取的 RNA 有基因组污染。

向裂解液中加入氯仿后，需要在低温下 (2-8℃) 高速离心。离心后，RNA 被抽提到上层的水相中，中、下层是有机相，含有氯仿。DNA 即存在于中层。氯仿在常温下会与水以一定的比例互溶，因此，常温离心会导致上层水相中也有少量基因组 DNA 污染。吸取上层液时，应非常小心，避免吸到中间层和下层，为此牺牲一点得率，保留一些上清不吸，是非常值得的。

❖ 加入异丙醇离心后看不见沉淀。

RNA 含量可能较低。建议加入异丙醇后在 4℃或-20℃放置 10-30 min 后再离心。若还看不见沉淀，那么在后面弃上清的操作时，采用吸取而不是倾倒的方法，以免沉淀丢失。

❖ RNA 应该如何保存？

建议分装后在-80℃长期保存。在-20℃可以短期保存，但应尽快使用。

❖ RT-PCR 反应失败。

RT-PCR 是多步反应，应首先检查反应体系。在确认 PCR 以及逆转录反应体系没有问题的情况下，RNA 降解是导致实验失败的最主要的原因。

通常 RNA 在提取过程中发生降解，并随着保存时间的延长，降解程度会不断增强。取少量新鲜提取或冻存的 RNA 跑 1%琼脂糖凝胶电泳，检验完整性。以哺乳动物细胞/组织为例，完整的总 RNA 在胶上能看见清晰的三条带，分子量从大到小分别为 28 s、18 s、5 s；若能看见三条带，但带型模糊或弥散，则说明 RNA 有部分降解，建议立即进行逆转录反应，并适量增大模板量。若无法立即进行逆转录，可在保存体系中加入 Rnasin (ATG #RC102)，可有效抑制 RNA 在存放过程中的降解。若只能看见分子量很小的一条带或没有条带，则说明 RNA 已完全降解，需要重新提取。

此外，RNA 的纯度也会影响后续反应。TRIzol Total RNA Extraction Reagent 提取 RNA 是基于异硫氰酸胍法，主要的杂质来自于异硫氰酸胍等盐的残留，对后续酶反应可能存在影响。因此需要用 75%乙醇 (用 DEPC 水配制) 重复洗涤沉淀 (轻弹管底让沉淀悬浮，并静置数分钟)。



025-85653525

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室