

ATGPure[®] TRIzol Reagent (Chloroform-free)

R211

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

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 |
| 实验流程 | 2 |
| 实验方案 | 3 |
| 常见问题与解决方案 | 4 |

产品简介

ATGPure® TRIzol Reagent (Chloroform-free) 广泛适用于从培养细胞、动物组织、简单植物组织等样本中提取 Total RNA。与传统 TRIzol 法相比，本产品使用方法简单，全程常温操作，且无需使用氯仿进行分层。此外，本产品将蛋白质、DNA、多糖等杂质沉淀至管底，RNA 分布在上层溶液中，可有效去除杂质，保证了提取的 RNA 完整性和纯度。本产品在 1 h 内即可完成全部的提取过程，获得的 Total RNA 可以直接用于 RT-PCR、RT-qPCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译和高通量测序等各种分子生物学实验。

产品组成

| 组分 | R211 (100 rxns) |
|--------------------------------|-----------------|
| ATGPure® TRIzol Reagent | 100 ml |
| TRIzol Assisted Buffer (氯仿替代物) | 35 ml |

储存条件

2~8℃ 保存

自备材料

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。
- ❖ 对内源 RNase 含量高、易被 RNaseA 降解、RNA 表达量较低的珍惜样本，如肝脏、胰腺、脾脏、肌肉或植物组织等，可考虑全程在 4℃ 下进行操作，最大程度保证 RNA 不被内外源 RNaseA 所降解。
- ❖ 不同品牌离心机的转子半径不同，离心力 ($\times g$) 与转速 (rpm) 可根据换算公式进行换算：

$$g = r \times 11.18 \times 10^{-6} \times \text{rpm}^2$$

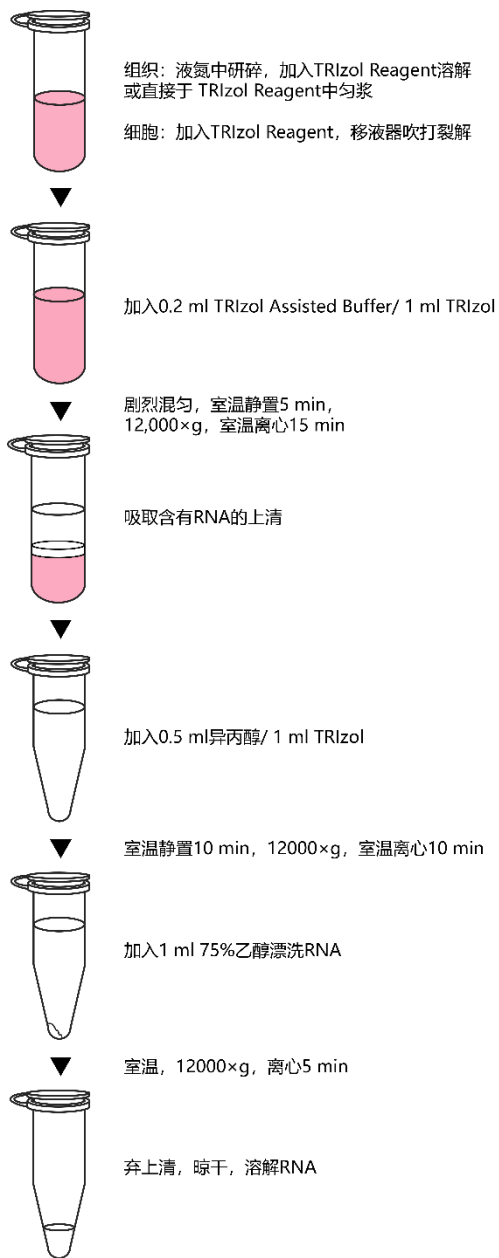
式中 r 为有效离心半径，即从离心机轴心到离心管桶底的长度，单位为 cm。

例如：

转速为 3000 rpm，有效离心半径为 10 cm，则离心力为： $10 \times 11.18 \times 10^{-6} \times 3000^2 = 1006.2 (\times g)$ 。

实验流程

实验流程概览：



实验方案：

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 ATGPure[®] TRIzol Reagent。一般 6 孔板每孔加 1 ml ATGPure[®] TRIzol Reagent，12 孔板每孔加 0.5 ml ATGPure[®] TRIzol 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 ATGPure[®] TRIzol 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 ATGPure[®] TRIzol 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 ATGPure[®] TRIzol 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，ATGPure[®] TRIzol Reagent 裂解后可能会有不溶物或油脂状漂浮物，需 12,000 ×g，4℃ 离心 10 min，接着吸取澄清的 ATGPure[®] TRIzol 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 ATGPure[®] TRIzol Reagent 加 0.2 ml TRIzol Assisted Buffer，用手剧烈震荡 15 sec，成乳浊液，室温静置 5 min。

5. 12,000 ×g，室温离心 15 min，吸取含有总 RNA 的上层无色水相至一新的离心管中。

❖ 每 1 ml ATGPure[®] TRIzol Reagent 约可吸取 0.5-0.55 ml。

6. 按每 1 ml 最初的 ATGPure[®] TRIzol Reagent 加入 0.5 ml 异丙醇，颠倒数次混匀，室温静置 10 min。

❖ 如果希望提取 microRNA 等小 RNA，推荐-70℃沉淀过夜。

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

8. 每 1 ml 最初的 ATGPure[®] TRIzol 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. $12,000 \times g$ ，室温离心 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 μl 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}/A_{280} 值会低于 1.6。

11. 取 1 μl RNA 至 9 μl DEPC 水或 TE 中，加入 2 μl $6 \times$ 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 2.0 之间。若在 1.8 左右，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。这比较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，再按实验流程 1-c 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，TRIzol Reagent 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°C 保存。

注意：不能直接将新鲜组织放在 -80°C 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。

❖ **加入异丙醇离心后看不见沉淀。**

样本中 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，采用吸取而非倾倒的方法，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 #RR101)，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。ATGPure® TRIzol 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