

描述: 海基 TRizol LS Reagent 是一种专门用于从液体样本（如细菌、病毒、酵母、细胞、血液、组织悬液）中提取高质量 RNA 的试剂。与 TRizol Reagent 相比，唯一区别在于其组分浓度，TRizol LS Reagent 是一种用于提取液体样本 RNA 的浓缩试剂，故提取相同量样本所需的用量相对较少。样品在 TRizol LS 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，提取过程方便快捷，整个操作在一小时内便可以完成。应用 TRizol LS Reagent 获得的总 RNA 蛋白质和 DNA 污染极少，可用于 Northern Blot、反转录、polyA 筛选、RNase 保护分析和基因克隆等后续分析。

注意: (1) 请勿应用该试剂直接处理大块固体组织，否则会影响 RNA 的产量。

(2) 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。

储存: 2-8℃避光保存，可保存 2 年。

自备试剂: 氯仿，异丙醇，70%乙醇（DEPC 水配置），Rnase Free H₂O。

操作方法

实验前准备:

RNA 制备的关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用 RNA 操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

注意事项:

1. 尽量使用一次性塑料器皿，若用玻璃器皿，应在使用前用 0.1%DEPC 水溶液在 37℃处理 12h，然后在 120℃高压灭菌 30min 以除去残留的 DEPC。
2. 用于 RNA 实验的试剂，须使用干热灭菌（180℃，60min）或 DEPC 水处理相关容器，使用的无菌水须用 0.1%的 DEPC 处理后再进行高温高压灭菌。
3. RNA 实验用的试剂和无菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

样本量及 RNA 产量

样本类型	样本量	RNA 产量
人全血	250 μl	3~10 μg
白细胞	1×10 ⁶ 个	10~20 μg
细胞	1×10 ⁶ 个	8~15 μg
肌肉/脑等组织	25 mg	10~25 μg
肝脏	25 mg	50~100 μg

TRizol LS 使用方法

样品类型 操作步骤	液体样本：抗凝全血、血清、病毒液	悬浮细胞、酵母、细菌	动植物组织	贴壁细胞
1. 样品预处理	粪便等固体样品，可用 PBS 重悬样品，并匀浆后，3000rpm 离心 5min，取上清作为病毒液样品。其它样品直接使用即可。	如样本中细胞含量低，则需要采用离心法沉淀细胞后使用 250 μ l 灭菌水重悬细胞再进行下面操作。	将样品转移至用液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状。	每 10 cm^2 生长的培养细胞中倒出培养液，用 PBS 清洗一次，尽可能移除多余的溶液。
2. 加入 TRizol-LS	取 250 μ l 液体样品加入到装有 750 μ l TRizol-LS 的 1.5ml EP 管中。	向 250 μ l 液体样品中加入 750 μ l TRizol-LS。	将研磨好的组织加入到装有 750 μ l TRizol-LS 的 1.5ml EP 管中。	加入 750 μ l TRizol-LS，使裂解液均匀分布于细胞表面，然后使用移液枪吹打细胞使其脱落并转移至 1.5ml EP 管中。
3. 裂解样品	加入 TRizol-LS 后立即手腕用力上下颠倒至细胞、组织粉末等分散均匀，无块状物。室温静置 5min，使核酸蛋白复合物完全分离。			
4. 加水	液体样品不需要再额外加水。		加入 250 μ l RNase Free H ₂ O 混合均匀，静置 2min。	
5. 加氯仿	加入 200 μ l 氯仿，手腕用力振荡 15s，室温放置 2min。			
6. 离心分层	13,000rpm 离心 10min，吸取 600 μ l 无色上清至新的 1.5 ml EP 管中。			
7. 加异丙醇	向上述 600 μ l 上清液中加入 600 μ l 异丙醇，手腕用力上下颠倒数次，于 -20 $^{\circ}$ C 放置 5min。			
8. 离心沉淀总 RNA	13,000rpm 离心 10min，小心倒掉上清，留取底部总 RNA 沉淀。			
9. 漂洗总 RNA	向沉淀中每管加入 1 ml 70%乙醇，上下颠倒数次，13,000rpm 离心 5min，小心倒掉上清，留取底部 RNA 沉淀。			
10. 重复漂洗一次	重复步骤 9 再洗涤一次。			
11. 挥发残留乙醇	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（ \sim 20min）。			
12. 溶解总 RNA	每管加入 20 \sim 100 μ l TE Buffer 或 RNase Free H ₂ O 溶解总 RNA。			

常见问题分析

- 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)
 - 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)
 - 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)
- 解决方法：使用该试剂通常基因组 DNA 污染含量<0.1 ng/ μ l，如需要彻底去除 DNA 的污染，请使用 RNase Free DNase I (HaiGene: A3001) 消化去除基因组 DNA 污染。如使用金牌 cDNA 第一链反转录试剂盒(含基因组去除剂) (HaiGene: D0401) 则无需提前消化去除基因组 DNA 污染，该试剂盒中包含了去除基因组 DNA 污染的试剂。