

描述: 海基 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、 1×10^6 细胞) 也适用于大量样品 (≥ 1 g 组织、 $>10^7$ 细胞)。对人、动物、植物组织、细菌均适用，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 蛋白质和 DNA 污染极低，可用于 Northern Blot、反转录、poyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和基因克隆。

储存: 2-8℃ 避光保存，可保存 2 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。

操作方法

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

I 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 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) 或使用上述方法进行 DEPC 水处理灭菌后的玻璃容器盛装 (也可以使用 RNA 实验用的一次性塑料容器)，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。

II 实验操作

TRIzol Reagent 的使用量情况如下

10 cm ² 贴壁培养细胞	1 ml
1x10 ⁶ -10x10 ⁶ 悬浮培养细胞	1 ml
50-100 mg 的普通组织样品 (肌肉等)	1 ml
30-50 mg 的特殊组织样品 (肝、脾等)	1-2 ml
30-50 mg 的植物材料	1 ml
白细胞 (1×10^6)	1 ml

样本量及 RNA 产量

样本类型	样本量	RNA 产量
白细胞	1×10^6 个	10~20 μ g
植物材料	25mg	10~20 μ g
细胞	1×10^6 个	8~15 μ g
肌肉/脑等组织	50mg	10~25 μ g
肝脏	50mg	100~300 μ g

TRIZol 使用方法

	贴壁细胞	悬浮细胞、酵母、细菌	动植物组织
1. 样品预处理	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。	将悬浮培养细胞连同培养液一起倒入离心管中，8,000 rpm 离心 2min，弃上清，加入 50μl 无菌水重悬细胞至无明显沉淀。	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。
2. 加入 TRIZol	加入 1 ml TRIZol，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。将细胞的裂解液转移至 1.5ml EP 管中。	加入 1ml TRIZol。	将研磨好的组织加入到装有 1 ml TRIZol 的 1.5ml EP 管中。
3. 裂解样品	加入 TRIZol 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. 加氯仿	加入 200 μl 氯仿，手腕用力振荡 15s，室温放置 2min。		
5. 离心分层	13,000rpm 离心 10min，吸取 600 μl 无色上清至新的 1.5EP 管中。		
6. 加异丙醇	向上述 600 μl 上清液中加入 600 μl 异丙醇，手腕用力上下颠倒数次，于 -20℃ 放置 5min。		
7. 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。		
8 漂洗总 RNA	向沉淀中每管加入 1ml 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。		
9. 重复漂洗一次	重复步骤 8 再洗涤一次。		
10. 挥发残留乙醇	倒掉洗液，再次短离心 10s 后，用 10 μl Tip 头吸干剩余的洗液，置于室温使乙醇挥发干净（~20min）。		
13. 溶解总 RNA	每管加入 20~100μl 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 500μl；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<0.1ng/μl，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。