

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		50 mL	100 mL
Total RNA Extraction Reagent (Trizol)	RM30129	50 mL	100 mL

产品说明

Total RNA Extraction Reagent (Trizol) 可以从动物组织、植物材料、各种微生物以及培养细胞等样品中提取总 RNA。该方法对少量的组织(50-100 mg)和细胞(5×10^6)以及大量的组织($\geq 1g$)和细胞($> 10^7$)均有较好的分离效果。样品在 Total RNA Extraction Reagent 中被充分裂解的同时能够最大限度地保证 RNA 的完整性。在加入氯仿离心后, 溶液会分成三层: 上层无色水相、中间层和下层红色有机相, RNA 分布在上清层中。收集上清层后, 经异丙醇沉淀便可以回收得到总 RNA。提取的总 RNA 完整性好, 无蛋白和 DNA 污染。

Total RNA Extraction Reagent (Trizol) 试剂能促进不同种属不同分子量大小的多种 RNA 的析出。例如, 从大鼠肝脏抽提的 RNA 琼脂糖凝胶电泳并用溴化乙啶染色, 可见许多介于 7 kb 和 15 kb 之间不连续的高分子量条带(mRNA 和 hnRNA 成分), 两条优势核糖体~5 kb (28S) 和~2 kb (18S), 低分子量 RNA 介于 0.1 和 0.3 kb 之间 (tRNA、5S)。当抽提的 RNA 用 TE 稀释时其 A260/A280 比值 ≥ 1.8 。**注意如果是普通琼脂糖凝胶电泳, 28S 的位置大约在 2 kb, 18S 大约在 1 kb 的位置, 不同浓度的凝胶位置变化较大。**

保存温度

4°C保存。试剂偶有颗粒沉淀不影响实验效果。

注意事项

- 本品中含有苯酚, 具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会导致中毒、灼伤以及其他身体伤害。使用本产品时应穿戴防护用品, 如防护服、手套、眼罩、面罩等。如果不小心接触, 应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。
- 样品用 Total RNA Extraction Reagent 匀浆后, 如果不即刻加入氯仿之前, 置于-70°C 下可放置一个月以上。保存在 75%乙醇中的 RNA 沉淀, 2-8°C可以保存一周, -20°C条件下可以保存 1 年。RNA 半衰期比较短, 容易降解, 建议提取后尽快进行后续实验, 如反转录成 cDNA, Northern Blot 等。

适用范围

可用于各种分子生物学常规实验, 如 RT-PCR、Real-time RT-PCR、Northern blot、Dot Blot、体外翻译等。

操作说明

实验提示

- 使用 Total RNA Extraction Reagent 抽提 RNA 时请戴手套和护眼罩。
- 操作时注意避免接触皮肤和衣服, 以及因手产生 RNase 的污染。
- 在化学通风橱完成操作, 避免呼吸道吸入。
- 如无特殊说明, 所有的操作应该在在 15-30°C的室温条件下进行。

实验准备

用户需自备氯仿、异丙醇(新开封 RNA 提取专用)、75%乙醇(用 DEPC 处理过的水配制)、RNase free water 或者 DEPC 处理过的水。

实验方法

- 匀浆
 - 植物组织:** 取新鲜植物组织在液氮中充分研磨或将植物组织剪碎后直接在 Total RNA Extraction Reagent 中迅速研磨, 每 50-100mg 组织加入 1 mL Total RNA Extraction Reagent, 混匀。
注: 样品体积一般不要超过 Total RNA Extraction Reagent 体积的 10%。
 - 动物组织:** 取新鲜或-70°C冻存动物组织尽量剪碎, 每 30-100 mg 组织加入 1 mL Total RNA Extraction Reagent, 匀浆仪进行匀浆处理。或对于 RNA 完整性要求较高的情况, 可在液氮中研磨后加入 Total RNA Extraction Reagent 1 mL 混匀。
注: 样品体积一般不要超过 Total RNA Extraction Reagent 体积的 10%。

- c. **单层培养细胞**: 尽量去除干净残留培养液后直接往直径 3.5 cm 的培养板中加入 1 mL 的 Total RNA Extraction Reagent 覆盖并反复吹打裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的 Total RNA Extraction Reagent 量 (每 10 cm² 加 1 mL)。当 Total RNA Extraction Reagent 量不足时可导致抽提的 RNA 中污染有 DNA。
- 注: 贴壁培养细胞往往不能完全从培养瓶(皿)脱落, 在 Total RNA Extraction Reagent 作用下此时细胞膜已经完全破裂开, 并已释放出全部 RNA, 细胞贴壁不影响实验。吸尽培养液, 每 10 cm² 细胞加入 1 ml Trizol。一般六孔板每孔加 1 ml Trizol, 12 孔板每孔加 0.5 ml Trizol。晃动 3-5 下, 再用移液器吹打 2-3 下, 确保全部裂解, 然后吸至离心管中。**
- d. **细胞悬液**: 离心收集细胞。在 Total RNA Extraction Total RNA Extraction Reagent 试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每 5 ~ 10 × 10⁶ 的动物细胞, 植物或酵母菌细胞或每 1 × 10⁷ 细菌加 1 mL 的 Total RNA Extraction Reagent。在加入 Total RNA Extraction Reagent 前应避免洗涤细胞, 因为那样会增加 RNA 降解的可能性。难以破裂的某些酵母菌与细菌建议使用匀浆器。
2. 将匀浆样品剧烈震荡后在室温条件下放置 5 分钟以使核蛋白体完全解离。
3. 可选步骤: 在 4°C 的条件下以 12,000 rpm (~ 13,400 × g) 的离心力离心 10 分钟, 取上清。
- 注: 如样品中含有较多蛋白质、脂肪、多糖或肌内、植物的块茎结节等, 可离心去除。离心后的沉淀中包含有细胞外膜, 多糖, 以及高分子量 DNA, 上清中含有 RNA。处理脂肪组织的样品时, 上层是大量油脂应除去。取澄清的匀浆液进行下一步。**
4. 每 1 mL Total RNA Extraction Reagent 加 0.2 mL 氯仿。盖紧管盖, 剧烈震荡 15 秒并将其在室温下放置 2 ~ 3 分钟。
5. 4°C, 12,000 rpm (~ 13,400 × g) 的离心力高速冷冻离心 10-15 分钟。离心后混合物分为三层: 下层红色有机苯酚氯仿层, 中间层, 上层无色的水样层。RNA 存在于水样层当中。水样层的容量大约为所加 Total RNA Extraction Reagent 容量的 50-60%。(有机层和中间层是蛋白和 DNA)。
6. 离心将水样层转移到一干净的离心管中, 加入等体积异丙醇。颠倒混匀后室温放置 10 分钟。
- 注: RNA 沉淀在离心前通常不可见, 离心后在管侧和管底形成胶状沉淀。**
7. 室温或者 4°C, 12,000 rpm (~ 13,400 × g) 离心 10 分钟, 弃上清。
8. 加 75% 乙醇洗涤沉淀。每使用 1 mL Total RNA Extraction Reagent 用 1 mL 75% 乙醇对沉淀进行洗涤。
- 注: 使用移液器吹打至 RNA 沉淀轻轻悬浮, 但不要吹散。**
9. 室温或者 4°C, 12,000 rpm (~ 13,400 × g) 离心 3 分钟, 弃上清, 注意不要丢失 RNA 沉淀。
- 注: 剩余的少量液体可短暂离心, 然后用枪头吸出, 注意不要吸弃沉淀。**
10. 室温放置 2-3 分钟, 晾干。加入 30-100 μL RNase free water, 充分溶解 RNA, 得到的 RNA 保存在 -70°C, 防止降解。
- 注: 沉淀不要过分干燥, 以免难以溶解。**

RNA 浓度、纯度等测定

1. 测定 OD 值, 根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 计算 RNA 浓度。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值可初步判断 RNA 质量, 比值在 1.6-2.0 之间均属正常。但即便是已降解的 RNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值也能达到看似完美的 2.0 左右, 因此该比值并非判断 RNA 降解与否最佳的指标。判断 RNA 质量的最佳途径是进行普通 RNA 琼脂糖电泳检查 RNA 完整性。
2. 检查 RNA 完整性。取 1 mg RNA 样品进行 1% 普通琼脂糖凝胶电泳。溴化乙锭染色, 紫外灯观察。28S RNA (常见 5 kb 位置) 亮度应该约为 18S RNA (常见 2 kb 位置) 的两倍, 有时可见 0.1-0.3 kb 的 5S RNA。
- 注: 如果是普通琼脂糖凝胶电泳, 28S 的位置大约在 2 kb, 18S 大约在 1 kb 的位置, 不同浓度的凝胶位置变化较大。**

常见问题与解决方案

抽提得率低

1. 样品匀浆或裂解不完全, 减少样品的量或增加 Total RNA Extraction Reagent 的量。组织块用液氮研磨, 效果最好。若没有液氮或电动匀浆器, 可用手动匀浆器代替, 此时组织块不宜过大, 且需先用眼科剪将组织绞碎, 然后再充分研磨。
2. 样品量太少, 增加样品量。

A₂₆₀/A₂₈₀ 比值 < 1.65

1. 若起始组织量过大, 或吸取了有机相或碎片, 会使 RNA 样品中蛋白和杂质含量高, RNA 沉淀乙醇洗涤不充分, 均可导致 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值降低。建议增加 Total RNA Extraction Reagent 用量。
2. 此步骤不可忽略: 加入 Total RNA Extraction Reagent 后样品在室温下放置 5 分钟。

3. 吸取上层无色透明液体时，吸到了下层有机相：小心吸取，勿吸下层有机相。
4. 用 TE 或离子强度较高的溶液溶解时 OD 值 \geq 1.8，不影响 RNA 后续使用。

RNA 降解

1. 从动物体取下的组织没有立即进行抽提或冰冻保存。
2. 用于抽提的组织或 RNA 样品保存于-5 ~ 20°C，而不是存放于-70 ~ 80°C。
3. 细胞经胰酶过度消化。
4. 环境或者使用耗材，如：水溶液、枪头、其他试剂或试管中有 RNA 酶。
5. 用于琼脂凝胶电泳的甲醛 pH 低于 3.5。
6. 加的 Total RNA Extraction Reagent 量太少，裂解不完全。建议增加 Total RNA Extraction Reagent 用量。
7. 用于抽提的样品包含有机溶剂（例如：乙醇、DMSO）、强缓冲液或碱性溶液。重新准备不含有有机溶剂的样品。