

问题指南:

问题	原因	解决方案
低 RNA 得率	裂解不完全	<ul style="list-style-type: none"> ● 将第 1、2 步的沉淀按步骤再处理一遍。 ● 减少初始样本量。 ● 眼科剪处理组织样本时需剪碎一点,使样本与 TRIzol 充分接触。
	样本质量差	RNA 的得率和质量对样本的新鲜度有较高要求,请使用新鲜样本,或在 -80℃ 中冻存不超过半年的样本。
	RNA 复溶操作不正确	使用无 RNA 酶的灭菌 DEPC ddH ₂ O 或 TE 缓冲液复溶,复溶体积不能加太多,人为降低了 RNA 浓度。
RNA 降解	RNA 样本中含有 RNase	将 RNA 样本按上述步骤再处理一遍。
	样本取材到裂解过程污染	组织离体或细胞离开培养基后需立即加入 TRIzol,保持 TRIzol 浸没状态,尽早进行 RNA 提取操作
逆转录效率低	RNA 样本中残留乙醇	重复步骤 9-13,过程中注重 RNA 干燥
	RNA 样本中残留盐离子	重复步骤 9-13
A260/A280 不在 1.7-2.0 之间	蛋白质或酚污染	重复步骤 4-13,再用有机相纯化一遍
	异硫氰酸 (TRIzol) 残留	重复步骤 4-13,再用有机相纯化一遍

版本号: 20160001

TRIzol[®] RNA 提取试剂盒

目录号: A2040A102

规格: 200T

2-8℃ 避光保存

试剂盒组成:

试剂	说明	货号	50T
Trizol Reagent	200 mL/瓶	B0A02-A	1 瓶
DEPC 水乙醇	100 mL/瓶	B0A02-B	1 瓶
氯仿	40 mL/瓶	B0A02-C	1 瓶
异丙醇	100 mL/瓶	B0A02-D	1 瓶
灭菌 DEPC ddH ₂ O	1.5 mL/支	A2010B0X01	4 支

产品简介:

TRIzol[®]是一种快捷方便的总 RNA 提取试剂,可以从动物组织、各种微生物及细胞等样本中提取总 RNA。在样品处理过程中,TRIzol 可完全充分裂解样品,同时保持 RNA 的完整性。加入氯仿离心后,溶液形成上清层(水相)、中间层和有机相(下层)。取出上清层,可用异丙醇沉淀回收 RNA;中间层用乙醇沉淀回收 DNA;有机相可用异丙醇沉淀回收蛋白。

本试剂盒提取 RNA 方便快捷,整个操作过程可在二个小时内完成,提取的 RNA 无蛋白和 DNA 的污染,纯度高,可直接用于 Northern Blotting、斑点杂交、polyA 筛选、mRNA 纯化、体外翻译、RNase 保护分析、RT-PCR、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

警告:

- 本产品仅供科研使用,勿用于医药、临床、食品及化妆品等其他用途;
- 本产品中部分试剂有腐蚀性或毒性,勿直接接触皮肤或吞咽;
- 操作时请穿戴实验服和手套,如接触皮肤,应立即用大量清水冲洗;
- 误食或其他紧急情况,请及时到医院救治;
- 部分试剂易燃,请注意消防安全。

其他需要自己准备的:

- 新鲜样本（组织、细胞）
- 1.5mL Eppendorf 管（无菌、无酶、RNase-free; 货号 A2010B0X04）;
- Tips(RNase-free)（1000 μ L、200 μ L 的枪头; 货号 A2010B0X09）;
- 移液器（200 μ L, 1000 μ L）;
- 电动匀浆器或超声破碎仪;
- 12000g 冷冻离心机;

操作步骤:

- 1、称取 100mg 湿重组织, 加入 1000 μ L 的 TRIzol, 用眼科剪剪碎并用电动匀浆器或者手动匀浆器匀浆, 室温（20-25 $^{\circ}$ C）放置 5min, 使其充分裂解。
- 2、培养细胞至 1.5×10^6 以上, 加入 1000 μ L 的 Trizol, 用 1mL 的移液枪来回充分吹打 200 下左右, 或用超声破碎仪破碎细胞。室温（20-25 $^{\circ}$ C）放置 5min, 使其充分裂解。
- 3、4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 5min, 将上清转移至干净的离心管。
- 4、加入 200 μ L 氯仿, 上下颠倒混匀, 室温放置 15min。注: 禁用漩涡振荡器, 以免基因组 DNA 断裂污染。
- 5、4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 15min。
- 6、吸取上层水相, 至干净的离心管中。
注: 千万不要吸取中间界面。若同时提取 DNA 和蛋白质, 则保留下层酚相存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 若只提 RNA, 则弃下层酚相。
- 7、加入 500 μ L 异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温放置 10min。
- 8、4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 10min, 弃上清, RNA 沉于管底。
- 9、加入 500 μ L 75% DEPC 水乙醇, 温和振荡离心管, 悬浮沉淀。
- 10、4 $^{\circ}$ C 8000rpm 离心 5min, 弃上清。
- 11、室温干燥 5min。
- 12、加入灭菌 DEPC ddH₂O 溶解 RNA 样品, 57 $^{\circ}$ C 温育 5min。
- 13、所得 RNA 样本 -80 $^{\circ}$ C 储存备用。

其他注意事项:

- 基因组 DNA 含量较高的样本(如上皮组织), RNA 样本很容易残留基因组 DNA 污染, 强烈建议用 DNase 对基因组 DNA 进行消化处理。
- 组织和细胞裂解后, 加氯仿前, 样品可在 -80 $^{\circ}$ C 放置一个月以上;

- RNA 沉淀可以保存在 75% DEPC 水乙醇中, -20 $^{\circ}$ C 可保存一年以上。
- 1ml Trizol 可以提取 50-100mg 组织, 组织或细胞用量过多会导致多余组织无法完全裂解释放 RNA 形成杂质, 增加了 RNA 纯化的难度以及基因组 DNA 污染的风险。
- DEPC 是可挥发的剧毒物, 使用时需在通风橱中操作, 高温可水解成乙醇和二氧化碳。

RNA 质量控制:

- 测 O.D 值定量 RNA 浓度, 测定 RNA 产物溶液在 A260 和 A280 的 O.D. 值, A260/A280 值在 1.7-2.0 之间说明 RNA 提取结果良好。（<1.7 时表明有蛋白质、基因组 DNA 或酚污染, >2.0 时表明可能有异硫氰酸（TRIzol）残存）
- 逆转录 cDNA, 将所有样本做一次内参 PCR 以及基因组内含子内参 PCR 预实验, 判断 RNA 的量以及基因组 DNA 污染情况。

预防 RNase 污染, 应注意以下几个方面:

- 经常更换新手套, 以防止 RNase 污染;
- 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染;
- RNA 在 Rnazol 试剂中短时间内不会被 RNase 降解, 但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料或玻璃器皿（玻璃器皿可在 150 $^{\circ}$ C 烧烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟, 然后用 DEPC 水彻底清洗, 再灭菌, 即可去除 RNase）;
- 配制溶液应使用 RNase-free ddH₂O（货号 A2010B0X01）

参考得率:

- 小鼠肝脏组织: (μ g RNA/mg 组织) 3.0-5.5 μ g;
- 小鼠肾脏组织: (μ g RNA/mg 组织) 1.5-3.0 μ g;
- 小鼠脾脏组织: (μ g RNA/mg 组织) 1.5-3.5 μ g;
- 小鼠心脏组织: (μ g RNA/mg 组织) 0.4-1.0 μ g;
- 小鼠肺组织: (μ g RNA/mg 组织) 0.6-1.2 μ g;
- 小鼠脑组织: (μ g RNA/mg 组织) 0.4-0.8 μ g;
- 293T 细胞: (μ g RNA/10⁶ 细胞) 8-10 μ g;
- HeLa 细胞: (μ g RNA/10⁶ 细胞) 20 μ g。