

Trizol 使用说明书

一、分离纯化的基本原理

研究基因的表达和调控时常常要从组织和细胞中分离和纯化 RNA。RNA 质量的高低常常影响 cDNA 库，RT-PCR 和 Northern Blot 等分子生物学实验的成败。Trizol 是一种新型总 RNA 抽提试剂，内含异硫氰酸胍等物质，能迅速破碎细胞，抑制细胞释放出的核酸酶。

二、用户需自备的试剂和材料

无水乙醇、氯仿、Glycogen（可能需要）、1.5ml Eppendorf 管（RNase-free）、Tips（RNase-free）

三、准备工作

RNase 酶非常稳定，是导致 RNA 降解最主要的物质。它在一些极端的条件可以暂时失活，但限制因素去除后有迅速复性。用常规的高温高压蒸气灭菌方法和蛋白抑制剂都不能是 RNase 完全失活。它广泛存在于人的皮肤上，因此，在与 RNA 制备有关的分子生物学实验时，必须戴手套。RNase 的又一污染源是取液器，根据取液器制造商的要求对取液器进行处理。一般情况下采用用 DEPC 配制的 70%乙醇擦洗取液器的内部和外部，基本达到要求。取 RNase-free 的物品时必须戴手套。

1、料制品的处理

尽可能使用无菌，一次性塑料制品，已标明 RNase-Free 的塑料制品，如没有开封使用过通常没有必要再次处理。对于国产塑料制品，原则上都必须处理方可使用。处理步骤如下：

- 1) 在玻璃烧杯中注入去离子水，加入 DEPC 使 DEPC 的终浓度为 0.1%。注意：DEPC 为剧毒物，活性很强，小心在通风柜中使用。
- 2) 处理的塑料制品放入一个可以高温灭菌的容器中，注入 DEPC 水溶液，使塑料制品的所有部分都浸泡到溶液中。
- 3) 在通风柜中室温处理过夜。
- 4) 将 DEPC 水溶液小心倒到废液瓶中，用铝箔封住含已 DEPC 水处理过的塑料制品的烧杯，高温高压蒸气灭菌至少 30 分钟。
- 5) 烘箱用合适的温度烘烤至干燥。置于干净处备用。

2、玻璃和金属物品

250°C 烘烤 3 小时以上。

四、从组织中提取总 RNA

- 1) 液氮研磨，组织块直接放入研钵中，加入少量液氮，迅速研磨，待组织变软，再加少量液氮，再研磨，如此三次，按 50-100mg 组织/ml Trizol 加入 Trizol，转入离心管进行第 2 步操作。
- 2) 匀浆：组织样品按 50-100mg/ml Trizol 加入 Trizol。另外，组织体积不能超过 Trizol 体积的 10%，否则匀浆效果会不好，用电动匀浆器充分匀浆约需 1-2 分钟。

五、从细胞中提取总 RNA

- 1) 培养贴壁细胞：不须消化，可直接用 Trizol 进行消化、裂解，Trizol 体积按 $10\text{cm}^2/\text{ml}$ 比例加入。
- 2) 悬浮细胞可直接收集、裂解，每 1ml Trizol 可裂解 5×10^6 动物、植物或酵母细胞，或 10^7 细菌细胞。

六、操作步骤

- 1、细胞或组织加 Trizol 后，室温放置 5min，使其充分裂解。注：此时可放入 -70°C 长期保持。
- 2、12,000rpm 离心 5min，弃沉淀。
- 3、按 200ul 氯仿/ml Trizol 加入氯仿，振荡混匀后室温放置 15min。注：禁用漩涡振荡器，以免基因组 DNA 断裂。
- 4、 4°C 12,000g 离心 15min。
- 5、吸取上层水相，至另一离心管中。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°C 冰箱，若只提 RNA，则弃下层酚相。
- 6、按 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀，室温放置 5-10min。
- 7、 4°C 12,000g 离心 10min，弃上清，RNA 沉于管底。
- 8、按 1ml 75%乙醇/ml Trizol 加入 75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀。
- 9、 4°C 8,000g 离心 5min，尽量弃上清。
- 10、室温晾干或真空干燥 5-10min。注：RNA 样品不要过于干燥，否则很难溶解。
- 11、可用 50ul H_2O ，TE buffer 或 0.5%SDS 溶解 RNA 样品， $55-60^\circ\text{C}$ ，5-10min。注： H_2O 、TE 或 0.5%SDS 均须用 DEPC 处理并高压。
- 12、测 OD 值定量 RNA 浓度。注：此方法提取 RNA A_{260}/A_{280} 值在 1.6-1.8 之间；产率估计：组织标本： $(\mu\text{g RNA}/\text{mg 组织})$ 1-10 μg ，培养细胞 ($\mu\text{g RNA}/10^6 \text{ Cell}$)：5-15 μg 。注：组织或细胞量过少，可酌情减少 Trizol 用量；组织或细胞用量过多，会引起 DNA 对 RNA 的污染；高蛋白、脂肪或多糖类组织，肌肉组织或块状植物组织等，组织匀浆或液氮研磨后须 4°C 12,000g 离心 10min 去掉不溶物，再进行下面操作，若顶层有脂肪物，则也须去掉；热天提 RNA，带手套是必须的，手是 RNase 的主

要来源；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，且需先用眼科剪刀将组织碱碱剪碎，然后再充分研磨。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：5446 0832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

