



## Trizol LS (液体样本RNA抽提试剂)

产品货号: R1100

储存条件: 2~8°C

### 适用范围:

适用于各种来源液体或者固体样品总RNA、DNA、蛋白的快速抽提

### 产品介绍:

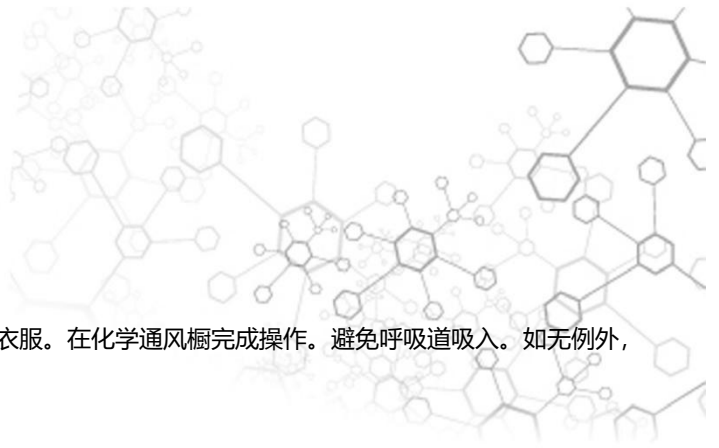
Trizol LS试剂是直接来源于人, 动植物, 酵母, 细菌和病毒的液体样品中提取总RNA的试剂。它在破碎和溶解细胞时能保持RNA的完整性。加入氯仿后离心, 样品分成水样层和有机层。RNA存在于水样层中。收集上面的水样层后, RNA可以通过异丙醇沉淀来还原。在除去水样层后, 样品中的DNA和蛋白也能相继以沉淀的方式还原。乙醇沉淀能析出中间层的DNA, 在有机层中加入异丙醇能沉淀出蛋白。共纯化DNA对于样品间标准化RNA的产量十分有用。

无论是人、动物、植物还是细菌组织,该方法对少量的组织(50-100mg)和细胞( $5 \times 10^9$ )以及大量的组织( $\geq 1g$ )和细胞( $> 10^7$ )均有较好的分离效果。Trizol LS试剂操作上的简单性允许同时处理多个的样品。所有的操作可以在一小时内完成。TRIpure LS抽提的总RNA能够避免DNA和蛋白的污染。故而能够作RNA印迹分析、斑点杂交、poly(A)+选择、体外翻译、RNA酶保护分析和分子克隆。如果是用于PCR, 当两条引物位于单一外显子内时, 建议用扩增级的DNase I来处理抽提的总RNA。Trizol LS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7kb和15kb之间不连续的高分子量条带, 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 $\geq 1.8$ 。

### 注意事项:

- 1.当Trizol LS用量少于2ml时建议使用清洁的一次性的聚丙烯材质试管。
- 2.当Trizol LS用量较大时, 可以使用玻璃试管(Corex)或聚丙烯材质试管, 事先检验以确保该试管可以耐受加入Trizol LS和氯仿后12,000xg的离心力。不可使用有裂缝或者破损的试管。
- 3.离心前小心平衡试管。
- 4.离心前玻璃管口必须盖上铝箔并用石蜡膜封口, 聚丙烯管必须盖紧。
- 5.从少量的组织(1~10mg)或细胞( $10^2 \sim 10^7$ )中分离RNA 样品:调整样品体积到0.25ml, 往组织或细胞中加入0.75ml Trizol LS。待样品裂解后, 加入氯仿并进行步骤2中的抽提操作。在用异丙醇沉淀RNA之前, 加入5~10ug 无RNA酶的glycogen作为水样层的载体。为降低其黏度在加入氯仿前用26号注射器抽吸两次以切断基因组DNA。Glycogen会留在水样层中并和RNA共析出。在浓缩到4mg/ml之前它不会抑制逆转录反应第一链的合成也不会抑制PCR。
- 6.在匀浆化后和加入氯仿之前, 样品可以在-60~-70°C保存至少一个月。RNA沉淀(步骤4, RNA漂洗)放置于75%的乙醇在2~8°C至少可以保存一周, 在-5~-20°C下至少可保存一年。
- 7.台式离心机最大能达到2,600xg的离心力的, 如果将离心时间延长到30~60分钟可以满足步骤2和步骤3中的操作。





## RNA抽提操作步骤:(实验前请先阅读注意事项)

### 提示:

用Trizol LS抽提 RNA时要戴手套和护眼罩。避免接触皮肤和衣服。在化学通风橱完成操作。避免呼吸道吸入。如无例外,所有的操作应该在在15~30°C的条件下。

### 实验所需试剂但未提供的物品:

- 1.氯仿
- 2.异丙醇
- 3.75%乙醇(用DEPC处理过的水配制)
- 4.无RNA酶的水或0.5% SDS溶液调配无RNA酶的水——将水加入无RNA酶的玻璃瓶中,加入DEPC至0.1% (v/v)。放置过夜并高压灭菌。SDS溶液必须用DEPC处理过并经高压灭菌的水配制。

### 1.匀浆化作用

#### a.生物液体

每0.25ml液体样品(血清,血浆,脑脊液等等)加入0.75ml Trizol LS,用加样枪吹打液体样品几次以帮助裂解样品中细胞。每 $5\sim 10\times 10^6$ 个细胞至少加入0.75ml Trizol LS。Trizol LS和液体样品的终体积比总是3:1。

#### b.组织

用glass或强力匀浆器搅匀组织样品,每50~100mg组织或者0.25ml组织悬液加0.75ml的Trizol LS。一般50~100mg组织体积都要小于0.25ml,如果组织样品的体积小于0.25ml,加入灭菌水将组织样品体积调整到0.25ml以保证体积比例是3:1。

#### c.单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入0.3ml-0.4ml的Trizol LS溶解细胞,用加样枪吹打帮助充分裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的Trizol LS量(每 $10\text{cm}^2$ 加0.3-0.4ml)。不需要往裂解物里面加水,因为培养板中附着残留的培养液已经充分稀释了Trizol LS。

#### d.悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在Trizol LS试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每 $5\sim 10\times 10^6$ 的动物细胞,植物或酵母菌细胞或每 $1\times 10^7$ 细菌加0.75ml的Trizol LS。和步骤b一样用灭菌水调节样品体积到0.25毫升。在加入Trizol LS前应避免洗涤细胞,因为那样会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

### 可选方案:

当样品富含蛋白质,脂肪,多糖或是细胞外物质例如肌肉,脂肪组织和植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在2~8°C的条件下以 $12,000\times g$ 的离心力离心10分钟,移除匀浆中不溶解的物质,余下的沉淀中包含有细胞外膜,多糖,以及高分子量DNA,而上层的超浮游物含有RNA。在来自于脂肪组织的样品中,大量的脂肪漂在最上层因而应该除掉。在每一个个案中,将清亮的匀浆溶液转移到一干净的试管中加入氯仿并继续进行下述的分离步骤。

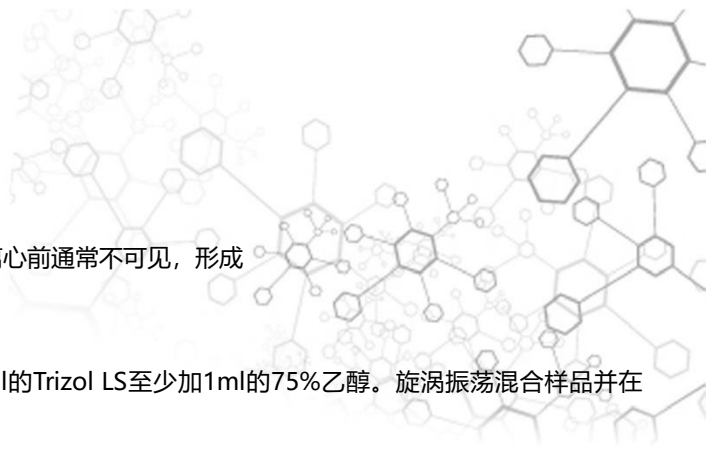
### 2.分离阶段

将匀浆样品在15-30°C条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。每0.75ml Trizol LS加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖,用手用力摇晃试管15秒并将其在30°C下孵育2~15分钟。在2~8°C下以不超过 $12,000\times g$ 的离心力高速冷冻离心15分钟。离心后混合物分成三层:下层苯酚-氯仿层,中间层,上层无色的水样层。RNA无一例外地存在于水样层当中。水样层的容量大约为所加Trizol LS 容量的70%。

### 3.RNA的沉淀

将水样层转移到一干净的试管中,如果希望分离DNA和蛋白,有机层同样要予以保留。通过将水样层和异丙醇混合来沉淀RNA。最初均化时的每0.75ml Trizol LS对应0.5ml异丙醇。将混合的样品在15-30°C条件下孵育10分钟并在2~8°C下以不





超过 $12,000\times g$ 的离心力高速冷冻离心10分钟。RNA沉淀在离心前通常不可见，形成一胶状片状沉淀附着于试管壁和管底。

#### 4.RNA的漂洗

移去上层悬液。用75%的乙醇洗涤RNA沉淀一次，每0.75ml的Trizol LS至少加1ml的75%乙醇。旋涡振荡混合样品并在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下以不超过 $7,500\times g$ 的离心力高速冷冻离心5分钟。

#### 5.RNA的再溶解

在操作的最后，简单干燥RNA沉淀（空气干燥或真空干燥5~10分钟）不要在真空管里离心干燥RNA。尤为重要，不能让RNA沉淀完全干燥那样会极大地降低它的可溶性。部分溶解的RNA样品其A260/280比值 $< 1.6$ 。用移液管尖分几次移取无RNA酶的水或0.5%SDS溶液来溶解RNA，并在 $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ 下孵育10分钟（当RNA以后要用于酶切反应时，避免使用SDS。）RNA还能被100%甲酰胺（除去离子）再溶解并保存在 $-70^{\circ}\text{C}$ 。

#### 注意事项

本品仅用于实验研究。

为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有毒物接触皮肤或者不慎吞服，会导致灼伤。一旦接触皮肤后立即以大量的洗涤剂和清水清洗。若感不适，看医生并寻求苯酚和其他成分的正确治疗方案。

