

# TRIzol总RNA提取试剂

说明书修订日期：2015.07.13

Cat Number: KGA1201-KGA1203

Store at 4°C for 12 months, 避光

For Research Use Only (科研专用)

## 一、试剂盒说明

凯基 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。

凯基 TRIzol 试剂可用于少量样品的 RNA 提取，也可用于大量样品的 RNA 提取。提取 RNA 整个过程方便快捷，整个操作过程可一个小时内完成，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。

## 二、试剂盒组份

组份	KGA1201	KGA1202	KGA1203	保存条件
TRIzol 试剂	20 ml	50 ml	100 ml	2-8°C, 避光

用户自备试剂：氯仿、异丙醇、75%乙醇（用 DEPC 处理过的水配制）、无 RNase 的无菌水。

## 三、注意事项

RNA 提取过程的关键是建立一个无 RNase 的实验环境，因此在整个操作过程中要防止 RNase 的污染，**应注意以下几点**：

1. 实验过程中经常更换新手套，使用专用超净台，在操作过程中避免讲话；
2. 应尽量使用无 RNase 的实验器材；枪头、塑料制品和玻璃制品可以用 0.1%DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在 37°C 处理过夜，然后在 120°C 下高压灭菌 30min 以去除残留的 DEPC。玻璃制品也可用干热灭菌去除 RNase (180°C 烘烤 2h)；
3. 配制溶液应使用无 RNase 水（无 RNase 水的配制方法：双蒸水加入 DEPC 至终浓度 0.01% V/V，放置过夜，然后 120°C 下高压灭菌 30min，备用）；
4. 整个实验过程中使用的试剂，实验器材和无 RNase 水应专用，避免交叉污染。
5. 本试剂含强变性剂，应避免与皮肤接触，如接触皮肤，应立即用大量的水冲洗，根据需要情况到医院处理。本品含有酚类、巯基乙醇等成分，具有特殊气味，请于吸取试剂溶液后马上盖好瓶盖，或于通风橱中操作。

## 四、操作步骤

1. 样品处理
  - A 贴壁培养细胞
    - ① 倒净培养液；
    - ② 每 10cm<sup>2</sup>生长的培养细胞中加入 1ml 凯基 TRIzol 试剂，在室温下水平放置 5min，使裂解液均匀分布于细胞表面，然后用移液枪吹打细胞使细胞脱落；
    - ③ 将细胞裂解液转移至离心管中，并用 1ml 枪头反复吹打直至裂解液中无明显沉淀，在室温下放置 5min，使得核蛋白复合物完全分离；

## B 悬浮培养细胞

- ① 直接离心收集细胞，倒净培养液；
- ② 细胞沉淀中每  $5\sim 10\times 10^6$  细胞加入 1ml 凯基 TRIzol 试剂；
- ③ 将细胞裂解液转移至离心管中，并用 1ml 枪头反复吹打直至裂解液中无明显沉淀，在室温下放置 5min，使得核酸蛋白复合物完全分离；

## C 动、植物组织材料

- ① 将组织在液氮中磨碎成粉末状（应无明显颗粒）；
  - ② 每 50~100mg 的组织加 1ml 凯基 TRIzol 试剂，样品的体积不应超过 TRIzol 试剂体积的 10%，并用匀浆器进行匀浆，直至匀浆液呈无颗粒透明状；
  - ③ 将细胞裂解液转移至离心管中，在室温下放置 5min，使得核酸蛋白复合物完全分离；
  - ④ 12,000g，4℃ 离心 10min，然后小心吸取上清液，移入新的离心管中；
2. 向上述步骤 1 得到的裂解液中加入氯仿（每使用 1ml 凯基 TRIzol 加 0.2ml 氯仿），盖紧离心管管盖，用手上下振荡 15s（**请勿涡漩激烈振荡**），得桔红色浑浊液，无分层现象，室温静置 3min；
  3. 12,000g，4℃ 离心 15min；
  4. 取出离心管，样品分为三层：黄色的上清水相、中间的白色层及粉红色的下层有机相。小心吸取黄色上清水相移至另一离心管，水相的体积约为所用凯基 TRIzol 试剂的 60%；
  5. 向步骤 4 得到的上清水相加入等体积的异丙醇，轻轻混匀，室温静置 10min；
  6. 12,000g，4℃ 离心 10min；
  7. 小心去除上清，缓慢沿管壁加入 1ml 75% 的乙醇（用 DEPC 处理过的水配制），轻轻混匀。每使用 1ml 凯基 TRIzol 试剂至少加 1ml 75% 的乙醇；
  8. 12,000g，4℃ 离心 10min；
  9. 小心吸尽上清；
  10. 室温干燥沉淀 2~5min（不可晾得太干，否则 RNA 将会很难溶解），加入 30~50 $\mu$ L 的无 RNase 水溶解 RNA 沉淀，待完全溶解后于 -70℃ 保存。取 RNA 样品用 1 $\times$ TE Buffer（见备注）稀释样品 100 倍或适当的倍数，测定样品在 260nm 和 280 nm 的吸收值确定 RNA 的质量。

RNA 的浓度 =  $OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 0.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ， $OD_{260/280}$  在 1.8~2.1 视为抽提的 RNA 的纯度很高。

## 五、常见问题分析以及解决方案

1. 一般情况下每毫克的组织或  $1\times 10^6$  个细胞中所能提取的 RNA 量见下表：

组织材料	TotalRNA 提取量
上皮细胞	约 10 $\mu$ g
成纤维细胞	约 6 $\mu$ g
肝脏	约 5 $\mu$ g
肾脏	约 3 $\mu$ g
肌肉或脑	约 1.5 $\mu$ g

2. 常见问题以及解决方案

常见问题	可能原因	建议解决方案
产率低	含有裂解液的样品经匀浆混匀后未在室温静置，或静置的时间不足 5 分钟	严格按照说明书操作
	RNA 不完全溶解	缩短晾干时间
	三相分离时，吸取上清液不完全	尽量回收上清液
$A_{260}/A_{280} < 1.65$	测定 OD 值时用的是水溶液	更换测定 OD 值时的溶液，用 TE Buffer

	TRIzol 加量太少, 造成蛋白质变性不充分	严格按照说明书操作
	含有裂解液的样品经匀浆混匀后未在室温静置, 或静置的时间不足 5 分钟	严格按照说明书操作
	RNA 不完全溶解	缩短晾干时间
	三相分离后, 吸取上清液时不小心接触蛋白层造成污染	小心吸取上清
<b>RNA 降解</b>	使用的组织材料不够新鲜	提取 RNA 的组织材料应采用新鲜的组织材料, 或将新鲜的组织材料用液氮迅速冷冻后置于-80℃保存
	细胞用胰酶消化	不要用胰酶消化细胞
	提取 RNA 时使用的试剂及器材中有 RNase 污染	做好试验前的准备工作, 保证无 RNase 污染
	提取的组织材料中含有大量的 RNase	加大 TRIzol 的用量
<b>DNA 污染</b>	裂解组织或细胞使用的 TRIzol 量偏少	加大 TRIzol 的用量
	使用的组织材料中含有大量的有机溶剂 (如: 乙醇、异丙醇等)、高浓度的 Buffer、碱性溶剂等	用 DEPC 水充分洗涤组织
<b>多糖的污染</b>	多糖的理化性质与 RNA 十分接近, 因此很难将其从 RNA 中除去	加大 TRIzol 的用量

凯基相关产品 (详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>)

### 1. 核酸提取纯化试剂

质粒提取试剂盒

基因组 DNA 提取试剂盒

DNA 回收试剂盒

RNA 提取试剂

### 2. PCR/RT-PCR 实验相关产品

PCR 产品

反转录酶

RT-PCR 试剂盒

PCR/RT-PCR 辅助试剂

DNA 分子量 Marker 以及电泳辅助试剂

### 3. 基因克隆产品以及生化酶制剂

超级感受态细菌制备试剂盒

T4 连接酶/生化酶

KeyGenTrans 交联型聚阳离子转染试剂