



GENESEED® TRIzol Reagent

产品介绍

TRIzol Reagent 是一种适用于各种动物组织、植物材料、各种微生物以及培养细胞等液体样本的广谱型总 RNA 提取试剂，具有极强的裂解能力，可在短时间内裂解细胞和组织样本，并有效抑制样本中 RNA 的降解，保持 RNA 的完整性。

该方法对少量的组织 (50 ~ 100mg) 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 TRIzol 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。

TRIzol Reagent 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 ~ 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 RNA 条带位于 ~ 5 kb (28S) 和 ~ 2 kb (18S)，低分子量 RNA 介于 0.1 ~ 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 2kb，18S 大约在 1kb 的位置，不同浓度的凝胶位置变化较大。

应用场景

提取的总 RNA 完整性好，无蛋白和 DNA 污染，可用于 RT-PCR、Real-time RT-PCR、Northern blot、Dot Blot、体外翻译等各种分子生物学实验。

产品组成

试剂盒组成	T0201
TRIzol Reagent	100 mL
CHCl ₃ Replacement 氯仿代替物	2 mL

1mL TRIzol Reagent 加入 100 μ L CHCl₃ Replacement 氯仿代替物 (仅需氯仿加入量的一半) 进行抽提，其他操作步骤不变。

储藏与保质期

冰袋运输。2 ~ 8°C 避光保存，有效期 12 个月。



自备材料

自备试剂	氯仿（三氯甲烷）或氯仿代替物
	异丙醇（新开封或提取 RNA 专用）
	75%乙醇（用 DEPC 水配制）
	RNase-freeH ₂ O 或 DEPC 水
所需设备	组织研磨和匀浆设备
	高速冷冻离心机
	涡旋振荡器
一次性耗材	1.5mL 或 2mL RNase-free 离心管
	RNase-free 枪头

注意事项

1. TRIzol Reagent 含有刺激性有害化合物，是强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤，请用大量清水或者生理盐水冲洗，严重时请立即到医院进行处理。
2. 样品用 TRIzol Reagent 匀浆后，如果不即刻加入氯仿之前，置于-80℃下可放置一个月以上。保存在 75%乙醇中的 RNA 沉淀，2~8℃可以保存一周，-20℃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。
3. 若下游实验对 DNA 非常敏感，建议用 RNase free DNase I 对 RNA 进行处理。
4. 实验操作中要避免 RNase 的污染和样本间的交叉污染。
5. 本产品仅作科研用途。

实验前准备

1. 尽量使用无菌 RNase-free 离心管、枪头等一次性塑料耗材，若使用玻璃器皿或非一次性工具应提前用 DEPC 处理或移除 RNase 污染产品。
 - (1) 将要处理的器皿工具用 0.1%DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在避光条件下，静置处理 12 小时。
 - (2) 然后在 121℃下高压灭菌 30 分钟以除去残留 DEPC。
2. 请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩进行试剂配制和实验操作，避免人为的 RNase 污染。



操作方法

提示：用 TRIzol Reagent 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。如无特殊说明，所有的操作在 15 ~ 30°C 室温条件下。

一、样品前处理：

1. 组织匀浆

a. **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 TRIzol Reagent 中迅速研磨，每 50 ~ 100mg 组织加入 1mL TRIzol Reagent，混匀。注意：样品体积一般不要超过 TRIzol Reagent 体积的 10%。

b. **动物组织**：取新鲜或 -80°C 冻存动物组织尽量剪碎，每 30 ~ 100mg 组织加入 1mL TRIzol Reagent，匀浆仪进行匀浆处理。或在液氮中研磨后加入 TRIzol Reagent 1mL 混匀。注意：样品体积一般不要超过 TRIzol Reagent 体积的 10%。

c. **单层培养细胞（贴壁细胞）**：尽量去除干净残留培养液后直接往直径 3.5cm 的培养板中加入 1mL 的 TRIzol 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 TRIzol Reagent 量（每 10cm² 加 1mL）。当 TRIzol Reagent 量不足时可导致抽提的 RNA 中污染有 DNA。

注意：贴壁培养细胞往往不能完全从培养瓶（皿）脱落，这并不意味着裂解不完全，此时细胞膜实际已经完全破裂开，并已释放出 RNA，继续做即可。

d. **悬浮细胞**：离心收集细胞。在 TRIzol 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 1mL 的 TRIzol Reagent。在加入 TRIzol Reagent 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。

二、提取步骤：

1. 将匀浆样品剧烈振荡后在室温条件下放置 5 分钟以使核蛋白体完全解离。

2. **可选步骤**：在 4°C 的条件下以 12,000 rpm 的离心力离心 10 分钟，取上清。如样品中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或肌肉，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。

3. **每 1mL TRIzol Reagent 加 0.2 mL 氯仿**。盖紧管盖，震荡 15 秒并将其在室温下放置 2 ~ 3 分钟。

4. **在 4°C 的条件下以 12,000rpm 的离心力高速冷冻离心 10 ~ 15 分钟**。离心后混合物分成三层：下层红色有机苯酚氯仿层，中间层，上层无色的水样层。RNA 存在于上清水样层中。水样层的容量大约为所加 TRIzol Reagent 容量的 50 ~ 60%。

5. **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。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。



- 在 4°C 的条件下，12,000 rpm 离心 10 分钟，弃上清。
- 加入 75%乙醇洗涤沉淀。每使用 1mL TRIzol Reagent 用 1mL 75%乙醇对沉淀进行洗涤。
- 在 4°C 的条件下，12,000 rpm 离心 5 分钟，弃上清，注意不要丢失 RNA 沉淀。注意：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。
- 室温放置 2~3 分钟，晾干。加入 30~100 μ L RNase free water，充分溶解 RNA，得到的 RNA 保存在 -80°C，防止降解。注意：沉淀不要过分干燥，以免难于溶解。

RNA 纯度的检验和分析

电泳分析

琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析 RNA 的质量。未降解的 RNA 可以观测到三条明亮、清晰、锐利的 RNA 条带，分别在 5Kb 左右 (28S, rRNA)，2Kb 左右 (18S, rRNA)，0.2Kb 左右 (5S, tRNA)。28S 条带亮度为 18S 条带亮度的两倍，5S 条带最淡，使用试剂盒提取时可能会只有两条带，没有 5S 条带。如果检测未成熟的前体 RNA 或不均一核 RNA、小核 RNA 提取出来的条带为介于 7Kb 和 15Kb 之间的不连续高分子量条带。如果观测的条带弥散、5S 条带明亮则说明 RNA 已降解。

吸光度分析

使用分光光度计测定 RNA 浓度时，一般采用 OD260/OD280 的比值，即蛋白和核酸的比值。纯 RNA 的 OD 比值在 1.8~2.1 之间。当 $R < 1.8$ 时，溶液中蛋白或者其他有机物的污染比较明显，当 $R > 2.2$ 时，说明 RNA 已经水解成单核酸。

常见问题与解决方案

1. 每 1mg 组织或 1×10^6 培养细胞预期的 RNA 产量

肝和脾，6~10 μ g；肾，3~4 μ g；骨骼肌和脑组织，1~1.5 μ g；胎盘，1~4 μ g；上皮细胞 (1×10^6) culture cells，8~15 μ g；纤维母细胞 (1×10^6) culture cells，5~7 μ g；

2. 提取的效率低

A. 样品裂解或匀浆处理不彻底；B. 最后得到的 RNA 沉淀未完全溶解。

3. RNA 降解

A. 从动物体取下的组织没有立即进行抽提或冰冻保存；B. 用于抽提的样品，或抽提的 RNA 样品保存于 -5~20°C，而不是存放于 -60°C~-80°C；C. 细胞经胰酶消化而分散；D. 水溶液或试管污染有 RNA 酶；E. 电泳时使用的甲酰胺 pH 低于 3.5。

4. A260/A280 < 1.6

A. 在分光光度计测量前应用 TE 缓冲液稀释 RNA 样品，低离子强度和低 pH 溶液会增加 280nm 处的光吸收值；B. 样品匀浆化时所加的 TRIzol Reagent 量太少；C. 匀浆化后样品没有在室温下放置 5min；D. 分离的水样层中污染有苯酚层；E. 最后得到的 RNA 沉淀未完全溶



解；F. 用于提取的样品包含有机溶剂（如乙醇，DMSO），强缓冲液或碱性溶液。

5. DNA 污染

A. 样品匀浆化时所加的 TRIzol Reagent 量太少；B. 样品中含有组织溶剂（如乙醇，DMSO 等），强缓冲液或碱性溶液。

6. 提取的 RNA 产量低

A. 样品未完全研磨匀浆或裂解。根据初始材料选择合适的裂解方式；将样本剪碎，必要时适量减少样本材料，浸入裂解液与其充分接触，并研磨匀浆；B. 样品质量差。使用新鲜样品或在 -80°C 、液氮中冷冻样品。

7. RNA OD260/OD280 吸光度比值 <1.6

A. RNA 洗脱未使用 pH7.5 10mM Tris-HCl, 低离子强度或低 pH 值会使 OD280 值升高；B. 乙醇漂洗后有乙醇残留。漂洗后可以适当延长静置时间，选择在通风处，充分晾干，使乙醇挥发。

8. 提取的 RNA 降解

A. 样品的收集保存、实验操作中裂解等步骤处理不当。新鲜样品应立即放入液氮中速冻，之后保存在 -80°C 冰箱中且避免反复冻融。或使用 RNA 样品储存液保护样品；B. 操作过程中或实验试剂被 RNase 污染。在实验前整理好专用的实验台，穿戴一次性手套、口罩，使用 RNase-free 的实验耗材，及时更换被污染的试剂。

9. 下游反应受到抑制

乙醇存在于纯化的 RNA 中。漂洗后可以适当延长静置时间，选择在通风处，充分晾干，使乙醇挥发。