



## GENESEED® TRIzol LS Reagent

### 产品介绍

TRIzol LS Reagent 适用于多种属液体样品总 RNA 的提取，适用范围广，样品可来源于人、动物、植物、酵母、细菌、病毒、血清、血浆、全血、体液等，提取完整性好。TRIzol LS 和液体样品的终体积比是 3:1。对少量的 50~100 mg 组织和  $5 \times 10^6$  细胞，以及大量的组织 ( $\geq 1$  g) 和细胞 ( $>10^7$ ) 均有较好的分离效果。

样品在 TRIzol LS 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 LS 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锭染色，可见许多介于 7 kb~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 ~ 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  $\geq 1.8$ 。注意：如果是普通琼脂糖凝胶电泳，28S 的位置大约在 2 kb，18S 大约在 1 kb 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。

### 产品规格

产品名称	产品货号	规格
GENESEED® TRIzol LS Reagent	T0101	100 mL

### 运输与保存

冰袋运输。2~8°C 避光保存，有效期 12 个月。

### 注意事项

1. 本品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会导致中毒、灼伤以及其他身体伤害。使用本制品时应穿戴防护物品，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不小心接触，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。
2. 样品用 TRIzol LS Reagent 匀浆后，如果不即刻加入氯仿之前，置于 -80°C 下可放置一个月以上。保存在 75%乙醇中的 RNA 沉淀，2~8°C 可以保存一周，-20°C 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. 自备试剂：氯仿、异丙醇（新开封或提取 RNA 专用）、75%乙醇（用 DEPC 处理过的水配制）、RNase free water 或者 DEPC 处理过的水。
5. 本产品仅作科研用途。

## 操作方法

提示：用 TRIzol LS Reagent 抽提 RNA 时佩戴手套和护眼罩。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，所有操作应该在 15~30°C 的室温条件下。

### 一、匀浆

#### 1. 生物液体（血清、血浆、脑脊液等）：

每 0.25mL 液体样品加入 0.75mL TRIzol LS Reagent，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 Reagent。TRIzol LS Reagent 和液体样品的终体积比总是 3:1。

#### 2. 动物组织：

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 Reagent。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。

#### 3. 单层生长细胞：

直接往直径 3.5cm 的培养板中加入 0.3 ~ 0.4mL 的 TRIzol LS Reagent 裂解细胞，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 Reagent 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 Reagent。

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。

#### 4. 细胞悬液：

通过离心来沉淀细胞。在 TRIzol LS Reagent 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 Reagent。和步骤 2 一样用灭菌水调节样品体积到 0.25mL。在加入 TRIzol LS 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。

#### 5. 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 LS Reagent 中迅速研磨，每 50 ~ 100mg 组织加入 0.75mL TRIzol LS Reagent，和步骤 2 一样用灭菌水调节样品体



积到 0.25mL，混匀。

## 二、总 RNA 提取

1. 将匀浆样品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 12,000rpm 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，上层有大量油脂应除去。取澄清的匀浆液进行下一步。
3. **每 0.75mL TRIzol LS Reagent 加 0.2mL 氯仿**。盖紧管盖，剧烈震荡 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：下层有机苯酚氯仿层，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 Reagent 容量的 70%。
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。
6. **在 4°C 的条件下以 12,000rpm 离心 10 分钟，弃上清**。
7. **加入 75%乙醇洗涤沉淀**。每使用 0.75mL TRIzol LS Reagent 用 1mL 75%乙醇对沉淀进行洗涤。
8. **4°C 12,000rpm 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。
9. **室温放置 2~3 分钟，晾干**。加入 30~100 $\mu$ L RNase free 水，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。

## 常见问题分析

1. **抽提率低**。可能原因：（a. 样品裂解或匀浆处理不彻底；b. 总 RNA 沉淀未完全溶解）
2. **RNA 降解**。可能原因：（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°C~-20°C，而不是存放于-60°C~-70°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. 用于琼脂糖凝胶电泳的福尔马林 pH 低于 3.5）
3. **A260/A280 比率<1.65**。可能原因：（a. 检测吸光度时，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. 样品匀浆时加的组织量过多；c. 分层后，吸取上清液不足 500 $\mu$ l；d. 吸取水相时混入了有机相）
4. **DNA 污染过多**。可能原因：（a. 样品匀浆时加的试剂量太少或组织量过多；b. 样品中含有有机溶剂）