

版本号: DP121221

TRNzol Reagent

TRNzol总RNA提取试剂

目录号: DP405

产品内容

目录号	产品组成
DP405-01	20 ml
DP405-02	100 ml

产品简介

TRNzol是可即用的从细胞和组织中提取总RNA的试剂，在样品裂解或匀浆过程中，TRNzol可保持RNA完整性，同时裂解细胞，溶解细胞内含物。

加入氯仿后，溶液分为水相和有机相，RNA在水相中。取出水相，用异丙醇可沉淀回收RNA；中间层用乙醇沉淀可回收DNA；有机相用异丙醇沉淀可回收蛋白。

TRNzol试剂可用于小量样品（50-100 mg组织、 5×10^6 细胞），也可用于大量样品（ ≥ 1 g组织或 $\geq 10^7$ 细胞），对人、动物、植物和细菌组织提取都适用，可同时处理大量不同样品。一个小时内即可完成反应，提取的总RNA没有DNA和蛋白的污染，可用于Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等。

产品特点

本公司生产的TRNzol为黄颜色，便于区分水相和有机相，方便使用。

保存条件

2-8°C 避光保存12个月。

注意事项

匀浆后，加氯仿前，样品可在-70°C 放置一个月以上；

RNA沉淀可以保存在75%酒精中，2-8°C一个星期以上或-20°C一年。

预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在TRNzol试剂中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150°C烘烤4 h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用RNase-Free ddH₂O。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(v/v)，放置过夜，高压灭菌）。

RNA提取操作步骤

准备试剂：氯仿、异丙醇、RNase-Free ddH₂O、75%乙醇（用RNase-Free ddH₂O配制）。

1. 匀浆处理

- a. 植物组织：以叶片RNA提取为例。取新鲜叶片在液氮中充分研磨或将叶片剪碎后直接在TRNzol中研磨，研磨要迅速，最好不要超过1 min。大约100 mg 叶片使用1 ml TRNzol。
- b. 动物组织：以鼠肝脏RNA提取为例。取新鲜或-70°C冻存组织，每30-50 mg组织加入1 ml TRNzol，用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积一般不要超过TRNzol体积的10%。
- c. 单层培养细胞：单层贴壁细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 1×10^7 ）：可直接在培养容器中裂解（容器体积不超过10 cm²），或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀。（在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法）。
 - 1) 直接裂解法：直接在培养板中加入TRNzol裂解细胞，每10 cm²面积加入1 ml TRNzol。用取样器吹打几次。**注意：TRNzol加量根据培养板面积决定，不是由细胞数决定。如果TRNzol加量不足，可能导致提取的RNA中有DNA污染。**

2) 胰蛋白酶处理法：确定细胞数量，吸除培养基，用PBS洗涤细胞，吸除PBS，向细胞中加入含有0.1-0.25%胰蛋白酶的PBS处理细胞，当细胞脱离容器壁时，加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶，将细胞溶液转移至RNase-Free的离心管中，300×g离心5 min，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清。

注意：收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净，否则会导致裂解不完全，造成RNA的产量降低。

d. 细胞悬液：离心取细胞。每 5×10^6 - 10^7 动物、植物和酵母细胞或每 10^7 细菌细胞加入1 ml TRNzol。加入TRNzol前不要洗涤细胞，以免降解mRNA。一些酵母和细菌细胞可能需要匀浆仪处理。

e. 血液处理：直接取新鲜的血液，加入3倍体积TRNzol（推荐0.25 ml全血加入0.75 ml TRNzol），充分振荡混匀。

2. 将匀浆样品在15-30°C放置5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

3. 可选步骤：4°C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，取上清。

注意：如果样品中含有较多蛋白、脂肪、多糖或肌肉、植物结节部分等，可离心去除。离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量DNA，上清中含有RNA。处理脂肪组织样品时，上层是大量油脂，应除去。取澄清的匀浆溶液进行下一步操作。

4. 每使用1 ml TRNzol加入0.2 ml氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15 sec，室温放置3 min。

注意：如不能旋涡混匀，可手动颠倒混匀2 min代替。

5. 4°C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10-15 min，样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和上层无色的水相，RNA主要在水相中，把水相（约600 μl）转移到新的离心管中。（**如要分离DNA和蛋白质，可向天根公司索取提取方法**）。

6. 在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇，混匀，室温放置20-30 min。

7. 4°C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，去上清。离心前RNA沉淀经常是看不见的，离心后在管侧和管底形成胶状沉淀。

8. 加入1 ml 75%乙醇(RNase-Free ddH₂O配置)洗涤沉淀。每使用1 ml TRNzol至少用1 ml 75%乙醇对沉淀进行洗涤。

9. 4℃ 5,000 rpm(~2,300×g)离心3 min。倒出液体，注意不要倒出沉淀，剩余的少量液体短暂离心，然后用枪头吸出，注意不要吸到沉淀。
10. 室温放置晾干（不要晾的过干，RNA完全干燥后会很难溶解，大约晾干2-3 min左右即可），根据实验需要，加入30-100 μl RNase-Free ddH₂O，反复吹打、混匀，充分溶解RNA。

不同组织或细胞RNA提取预期得率

植物叶片	100-200 μg/g 叶片
动物组织	6-10 μg/mg 肝脏组织
动植物培养细胞	5-10 μg/10 ⁶ 细胞
大肠杆菌	2-10 μg/ml DH5α过夜菌
血液	3-5 μg/ml 人全血

问题指南

低得率	<p>A. 样品裂解或匀浆处理不彻底。</p> <p>B. 最后得到的RNA沉淀未完全溶解。</p>
$A_{260}/A_{280} < 1.65$	<p>A. 检测吸光度时，RNA样品不是溶于TE，而是溶于水。 低离子浓度和低pH条件下，A_{280}值会较高。</p> <p>B. 样品匀浆时加的试剂量太少。</p> <p>C. 匀浆后样品未在室温放置5 min。</p> <p>D. 水相中混有有机相。</p> <p>E. 最后得到的RNA沉淀未完全溶解。</p>
RNA降解	<p>A. 组织取出后没有马上处理或冷冻。</p> <p>B. 样品或提取的RNA沉淀保存于-5~-20℃，未在-60~-70℃保存。</p> <p>C. 细胞在胰蛋白酶处理时被破坏。</p> <p>D. 溶液或离心管未经RNase去除处理。</p> <p>E. 电泳时使用的甲酰胺pH低于3.5。</p>
DNA污染	<p>A. 样品匀浆时加的试剂体积太少。</p> <p>B. 样品中含有组织溶剂(如乙醇，DMSO等)，强缓冲液或碱性溶液。</p>
蛋白和多糖污染	<p>A. 样品中蛋白、多糖含量高。</p> <p>B. 样品量太大。</p> <p>C. 水相中混有有机相。</p>