

Trizol LS 试剂说明书

产品组成

Cat. No.	5311005	5311100
Trizol LS 试剂	5 ml	100 ml
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

请将产品储存于 2~8°C，有效期为 3 年。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：电话：400-0099-857，QQ: 869912443，微信公众号：simgenbio，e-mail: technical@simgen.cn。

产品介绍

Trizol LS试剂是即用型细胞和组织总RNA提取试剂，可在一小时内从液态的人、动物、植物、酵母或细菌来源的细胞和组织样本中分离出高质量的总RNA（以及DNA和蛋白质）。在匀质化或溶解的样品中，Trizol LS试剂可保持RNA的完整性，对RNase活性具有高度有效的抑制作用，同时能破坏细胞及溶解细胞成分。加入Buffer EX或氯仿离心后，样本溶解物分离成水相和有机相，RNA存在于水相中，DNA和蛋白质处于有机相及相间。水相中的RNA可通过异丙醇沉淀回收；如果有需要，样品中的DNA和蛋白质可相继通过沉淀再次回收。

Trizol LS试剂提取的总RNA可用于Northern blot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。Trizol LS试剂可除去样本中大部分DNA，但不能彻底去除DNA，因此在RT-PCR反应中，如果设计的两条引物位于单个外显子中时，应选用DNase I（Simgen Cat. No. 8003050）处理分离出的RNA，或者选择含有DNA酶消化步骤的cDNA第一链合成试剂盒（Simgen Cat. No. 7306100）合成cDNA。

用户需自备的试剂与物品

1. Buffer EX（Simgen Cat. 9025100）或氯仿、异丙醇、75%乙醇（用 DEPC 处理水配制）、RNase-free 水或者 DEPC 处理水
2. RNase-free 的 1.5 ml 离心管和移液器及吸头
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 可能需要旋涡振荡器、液氮与研钵
6. 可能需要 70%异丙醇、PBS 溶液、无水乙醇、0.1 M 柠檬酸钠（溶于 10%乙醇，pH 8.5）、8 mM NaOH（DNA 提取）
7. 可能需要 5 ml 离心管、0.3 M 盐酸胍（溶于 95%乙醇）、1% SDS（蛋白质提取）

使用前准备

1. 了解“防止 RNA 酶污染的注意事项”。
2. 注意：Trizol LS 试剂中含有苯酚，会腐蚀皮肤，必须戴手套进行操作，请勿直接接触试剂。如果使用氯仿，应在化学通风橱中使用，避免吸入蒸气（推荐用 Buffer EX 替代氯仿）。
3. RNase-free 水处理方法：将去离子水加入到可灭菌的玻璃容器中，加入焦磷酸二乙酯（DEPC）至终浓度为 0.1% (v/v)，37°C 静置过夜，121°C，20 分钟灭菌。

操作步骤：

RNA提取步骤：

本操作步骤是为用750 μ l Trizol LS试剂提取RNA而设计的，如果从更多样本中提取RNA，须将所加的Trizol LS试剂及Buffer EX或氯仿、异丙醇、75%乙醇等用量按比例增加。Trizol LS试剂与样品体积比为3:1，一定要按指定的量加入Trizol LS试剂，否则提取的RNA会有DNA污染。当样品体积小于250 μ l时，请先加入RNase-free水将样品体积调整至250 μ l后再操作。

如果从RNA含量低的样本(1~10 mg组织或 10^2 ~ 10^4 细胞等)中提取RNA，可能会因RNA含量太低影响RNA的沉淀效率，建议在步骤4的异丙醇沉淀步骤中补加Carrier RNA (Simgen Cat. No. 4003101)。Carrier RNA的存在不影响RT-PCR。

1. 不同来源样品的处理：

液体样本（血液、血清、血浆、细胞培养上清等）：

取250 μ l液体样本加入到一个1.5 ml离心管中，再加入750 μ l Trizol LS试剂，用移液器吹打混匀，进入步骤3的操作。若样品体积<250 μ l，用RNase-free水将样品体积调节至250 μ l。

固体的人或动物组织：

按每50~100 mg人或动物组织中加入250 μ l RNase-free水的比例制备组织匀浆液，取250 μ l组织匀浆液加入到一个1.5 ml离心管中，再加入750 μ l Trizol LS试剂，用移液器吹打混匀，进入步骤3的操作。

培养的动物细胞：

贴壁培养的细胞：吸出培养皿中的培养基，每20 cm²细胞培养皿中直接加入750 μ l的Trizol LS试剂（不要补加水，培养皿中残留的培养基等效于补加的水），勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，吸取匀浆液转移到一个1.5 ml离心管中，进入步骤3的操作。

悬浮培养的细胞：用1.5 ml离心管离心收集5~ 10×10^6 细胞，加250 μ l PBS溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮，加入750 μ l Trizol LS试剂，勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，进入步骤3的操作。

植物组织 / 植物细胞 / 酵母 / 细菌：

在研钵中用液氮将约300~500 mg样品研磨至粉末状，再用液氮预冷的1.5 ml离心管称取约100 mg研磨成粉末状的组织，先加入200 μ l RNase-free水旋涡振荡混匀，再加入750 μ l Trizol LS试剂，勿弃吸头，直接用吸头吹打样本数次使其溶解，进入步骤3的操作。

2. **可选步骤：**如样品中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或胞外物质（肌肉，植物结节部分等）可于12000 $\times$ g离心5分钟，取上清。离心得到的沉淀中包含细胞外膜，多糖，高分子量DNA，上清中含有RNA。处理脂肪含量高的样品时，顶层所含的大量油脂应去除，取离心后澄清的溶液进入下一步操作。

3. 加入200 μ l Buffer EX或氯仿，盖上管盖，用力摇晃15秒，12000 $\times$ g离心15分钟。

* 氯仿挥发性强且有剧毒性，如果使用氯仿，此步骤应在化学通风橱中操作，以避免吸入氯仿蒸气。

4. 取一个RNase-free 1.5 ml离心管，加入500 μ l异丙醇，将步骤3中离心形成的清澈上相转移到装有异丙醇的1.5 ml离心管中。盖上管盖，混合均匀，12000 $\times$ g离心15分钟。

* 注意不要吸取相间沉淀，以免影响RNA的纯度。

5. 弃上清，加入1 ml 75%乙醇，盖上管盖，温和地翻转离心管4~6次，7500 $\times$ g离心5分钟。

6. 弃上清，盖上管盖，低速离心数秒使管壁上的乙醇沉降到管底。用200 μ l吸头吸尽残留的乙醇，保留管底及管壁的白色RNA沉淀。室温静置5分钟干燥RNA。

* 从某些样本中提取RNA时，RNA不是在离心管管底形成白点，而是会以均匀的薄雾状沉淀形式吸附在管壁上。请注意仔细观察并在步骤7操作时特别留意将RNase-free水加到管壁的相应位置上溶解RNA。

7. 加入50~100 μ l RNase-free水溶解RNA，并将RNA储存于-70 $^{\circ}$ C备用。

miRNA和大片段RNA分开提取步骤：

1. 按照上文RNA提取步骤操作到步骤3，吸取500 μ l上清液到一个新的RNase-free 1.5 ml离心管中。

2. 加入200 μ l 75%乙醇，混合均匀，室温孵育10分钟，12000 $\times$ g离心8分钟。此时大片段RNA将在管底形成沉淀，保留沉淀进入步骤4的操作。将含有miRNA的上清液转移到一个新的RNase-free 1.5 ml离心管中。

3. 加入500 μ l异丙醇（约0.8倍体积），混合均匀，在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟，12000 $\times$ g离心15分钟，弃上清。此时管底将形成miRNA沉淀。

* 如果miRNA含量低，可能观察不到沉淀，可在本步骤补加Carrier RNA（Simgen Cat. No. 4003101）提高沉淀效率。

4. 向大片段RNA沉淀（步骤2）中加入1 ml 75%乙醇，向miRNA沉淀（步骤3）中加入1 ml 70%异丙醇，混合均匀，8000 $\times$ g离心3分钟，弃上清。

* 如果观察到RNA沉淀较多，可重复本步骤一次，以减少RNA中盐分的残留。

5. 盖上管盖，低速离心数秒使管壁上的液体沉降到管底。用200 μ l吸头吸尽残留的乙醇或异丙醇，保留管底及管壁的白色RNA沉淀。室温静置5分钟干燥RNA。

* 注意：从某些样本中提取RNA时，RNA不是在离心管管底形成白点，而是会以均匀的薄雾状沉淀形式吸附在管壁上。请注意仔细观察并在步骤6操作时特别留意将RNase-free水加到管壁的相应位置上溶解RNA。

6. 向大片段RNA沉淀（步骤2）中加入50~100 μ l RNase-free水溶解大片段RNA，向miRNA沉淀（步骤3）中加入10~50 μ l RNase-free水溶解miRNA，并将RNA储存于-70 $^{\circ}$ C冰箱备用。

DNA提取步骤：

本操作步骤是衔接上文用750 μ l Trizol LS提取RNA的步骤而设计的，如果从更多样本中提取DNA，须将所加的无水乙醇、0.1 M柠檬酸钠溶液（溶于10%乙醇）、75%乙醇等用量按比例增加。

1. 按照RNA提取步骤操作到步骤3，移去水相后，加入300 μ l无水乙醇，盖上管盖，混合均匀，室温静置2-3分钟，不超过2000 $\times$ g离心5分钟以沉淀DNA，移去苯酚-乙醇上清液（如需要，保留上清用于蛋白质分离）。

* 移去水相后剩余的苯酚相和中间相可在2-8 $^{\circ}$ C保存过夜。

* 仔细移去水相，对于分离DNA的质量很重要。

2. 加入1 ml 0.1 M柠檬酸钠溶液（溶于10%乙醇，pH 8.5），盖上管盖，室温静置30分钟（间歇混匀DNA沉淀），2000 $\times$ g离心5分钟，弃上清。

3. 重复步骤2一次，加入1.5 ml 75%乙醇悬浮沉淀的DNA，室温静置10-20分钟（间歇混匀），2000 $\times$ g离心5分钟。

* 对于200 μ g以上的DNA或含有较多非DNA物质的大沉淀，需要增加0.1 M柠檬酸钠-10%乙醇溶液的洗涤次数。

* 悬浮于75%乙醇的DNA可在2-8 $^{\circ}$ C下保存数月。

4. 弃上清，盖上管盖，低速离心数秒使管壁上的乙醇沉降到管底。用200 μ l吸头吸尽残留的乙醇，保留管底的白色DNA沉淀。室温静置5-15分钟干燥DNA。

5. 加入300-600 μ l 8 mM NaOH溶解DNA。

* 必须用弱碱溶解DNA，因为沉淀的DNA在水中或Tris缓冲液中可能无法溶解。

* 若DNA（尤其是来自组织的DNA）中含有不溶性胶状物（膜碎片等），则12000 $\times$ g离心10分钟，将含DNA的上清转移到一个新管。

* 如果获得的DNA纯度差（A260/280比值<1.70），可选择DNA纯化试剂盒（Simgen Cat. No. 2101050）纯化DNA后再使用。

蛋白质提取步骤：

本操作步骤是衔接上文DNA提取步骤而设计的，如果从更多组织或细胞中提取蛋白质，须将所加的异丙醇、0.3 M盐酸胍溶液（溶于95%乙醇）、无水乙醇等用量按比例增加。用乙醇沉淀DNA后，蛋白质可从苯酚-乙醇上清中获得。由此产生的蛋白质可用于Western blotting分析。

1. 取5 ml离心管，加入1.5 ml异丙醇，将DNA提取步骤1中的苯酚-乙醇上清液加入并混合均匀。室温静置10分钟，12000 $\times$ g离心10分钟，弃上清。

2. 加入2 ml 0.3 M盐酸胍溶液（溶于95%乙醇），旋涡混匀蛋白质沉淀。室温静置20分钟，7500 $\times$ g离心5分钟，弃上清。

3. 重复步骤2两次，加入2 ml无水乙醇，旋涡混匀蛋白质沉淀。室温静置20分钟，7500×g离心5分钟。

* 用0.3 M盐酸胍溶液（溶于95%乙醇）或无水乙醇悬浮的蛋白质沉淀可在2~8℃保存至少一个月，或在-20℃保存至少一年。

4. 弃上清，真空干燥5~10分钟。吹打溶于1% SDS，蛋白质沉淀的完全溶解可能需要在50℃孵育。10000×g离心10分钟，弃沉淀的不溶物，并转移上清至新管。该样品可直接用于Western blotting或储存在-20℃备用。

* 为更有效地回收蛋白，可采用下述替代方法：在2~8℃，更换3次0.1% SDS，透析苯酚-乙醇上清。透析物10000×g离心10分钟，上清用于Western blotting。

常见问题与分析：

1. RNA降解

- 1) 样本贮存：组织样本取材后应立即置于液氮中速冻，然后移至-70℃冰箱保存；细胞样本应在收集后先加入250 μl RNase-free水涡旋混匀，后加入750 μl Trizol LS试剂，然后移至-70℃冰箱保存。如果不能立即放入-70℃冰箱保存，可选购RNA样本保存液（Simgen Cat. No. 4007020/4007100）保存样本。当使用RNA样本保存液时，应注意以下事项：
 - A. 只选用新鲜的、未反复冻融的样本加入RNA样本保存液保存；
 - B. 样本中加入RNA样本保存液后不要长时间室温存放。RNA样本保存液保存样本是有时间期限的，一般在37℃下只能保存1天，在15-20℃下可延长至1周，在2-8℃可延长至4周，若长期保存，应保存在-20℃以下。
- 2) 外源RNA酶的污染：试剂，器械及实验环境中的RNA酶进入实验系统。请特别注意防止RNA酶污染，改善实验条件和实验环境，确保在无RNA酶污染的条件下提取RNA。
- 3) 电泳检测时，推荐使用甲醛变性胶电泳（参考分子克隆第三版第540页）。如果没有甲醛变性胶电泳的条件，关注simgenbio微信公众号查询“如何做好RNA电泳实验”文章，获取相关实验技巧。

2. RNA提取率低

- 1) 多糖含量非常高的样本，比如一些植物的块茎、果实、种子及衰老的叶片（主要是淀粉类的多糖衍生物）和软骨组织（软骨属于多糖类物质）等，虽然能看到RNA沉淀（实际上主要的沉淀物是多糖），但是RNA的得率可能非常低。其主要原因是多糖类物质会和Trizol试剂形成不可溶解的沉淀，严重影响了RNA的释放。以上问题通常都可以通过购买植物总RNA试剂盒（Simgen Cat. No. 5101050）重新提取RNA得到解决；但如果是果肉类样本（水分含量高的），应选择果肉总RNA试剂盒（Simgen Cat. No. 5102050）；一些产生特殊粘多糖的植物样本或真菌样本，用植物总RNA试剂盒提取RNA时可能会堵塞纯化柱，如果有上述堵柱现象发生，则必须选择高多糖多酚植物总RNA试剂盒（Simgen Cat. No. 5103050）提取RNA。
- 2) 样本RNA含量低或样本未充分破碎或匀浆不彻底。
- 3) RNA沉淀没有被完全溶解。

3. RNA后续实验效果不佳

- 1) A260/A280比值<1.65。推荐使用RNA纯化试剂盒（Simgen Cat. No. 5401050）纯化RNA。
- 2) 使用了过多的RNA用作反转录模板。通常20 μl反转录反应体系中加入100~1000 ng RNA作为模板比较适宜。注意cDNA作为PCR模板时需要适当稀释，以免残留的反转录酶（包括已经失活的反转录酶）干扰Taq酶的活性。
- 3) 反转录后的DNA-RNA复合体对荧光PCR的影响。建议减少随机引物的用量或用特异性引物进行反转录，或者在反转录后添加RNase H进行处理，去除DNA-RNA复合体。