

# Trizol 法提取总 RNA

**原理：**Trizol 试剂是直接从细胞或组织中提取总 RNA 的试剂。在样品裂解或匀浆过程中，Trizol 能保持 RNA 的完整性。加入氯仿后离心，样品分成水样层和有机层。RNA 存在于水样层中。收集上面的水样层后，RNA 可以通过异丙醇沉淀来还原。在除去水样层后，样品中的 DNA 和蛋白也能相继以沉淀的形式还原。乙醇沉淀能析出中间层的 DNA，在有机层中加入异丙醇能析出有机层的蛋白。共纯化 DNA 对于样品间标准化 RNA 的产量十分有用。

Trizol 试剂可用于小量样品（50~100mg 组织， $5 \times 10^6$  细胞），也可用于大量样品（ $\geq 1$ g 组织或 $\geq 10^7$  细胞），对人、动物、植物和细菌、血液提取都适用，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 和蛋白质污染，可用于 Northern blot、RT-PCR、Dot blot、RNase 保护分析等。

本试剂为红颜色，便于区分水相和有机相，同时最大限度的保持 RNA 的完整性。

保存条件：2~8℃避光保存 12 个月。

## 实验前需要准备的试剂：

Trizol，氯仿，异丙醇，75%乙醇（用 RNase-Free 水配制），RNase-Free 水。

## 实验前需要准备的物品：

1ml 注射器，1.5ml EP 管（DEPC 处理过），大、中、小号枪头（DEPC 处理）

## 样品前处理注意点：

- 1.选择新鲜血液，不得超过 4 小时。
- 2.选择新鲜组织，生长旺盛的组织。
- 3.选择新鲜的幼嫩组织。
- 4.选择处于生长旺盛的时期收集细胞。



### RNA 纯化要求:

1. 纯化后不应存在对酶（如逆转录酶）有抑制作用的物质。
2. 排除有机溶剂和金属离子的污染。
3. 蛋白质、多糖和脂类分子等的污染降到最低程度。
4. 排除 DNA 分子的污染。

### RNA 提取的注意事项:

1. 杜绝外源酶的污染。
  - (1) 严格戴好口罩，手套。
  - (2) 实验所涉及的离心管，Tip 头，移液器杆，电泳槽，实验台面等要彻底处理。
  - (3) 实验所涉及的试剂/溶液，尤其是水，必须确保 RNase-Free。
2. 阻止内源酶的活性。
  - (1) 选择合适的匀浆方法。
  - (2) 选择合适的裂解液。
  - (3) 控制好样品的起始量。
3. 明确自己的提取目的。
  - (1) 任何裂解液系统在接近样品最大起始量时，提取成功率急剧下降。
  - (2) RNA 提取成功的唯一经济的标准是后续实验的一次成功，而不是得率。

## Rnase 污染的 10 大来源

1.手指头

2.枪头

3.水/缓冲液

4.实验台面

5.内源 Rnase

6.RNA 样品

7.质粒提取

8.RNA 保存

9.阳离子 (Ca, Mg)

10.后续实验所用的酶

## 流程：

### 1.样品处理：

(1) 培养细胞：收获细胞  $1\sim5\times10^7$ ，加入 1ml Trizol (异硫氰酸胍/酚) (在冰箱旁边取出白细胞即刻加入 Trizol)，混匀；用 1ml 注射器反复抽取 (约 30 次) 以破裂细胞及剪切 DNA，室温静置 5min (使核酸蛋白复合物完全分离)。

(2) 组织：取 50~100mg 组织 (新鲜或  $-70^{\circ}\text{C}$  及液氮中保存的组织均可) 置 1.5ml EP 管中，加入 1ml Trizol 充分匀浆，室温静置 5min。

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  $2\sim8^{\circ}\text{C}$   $10000\times g$  离心 10 分钟，取上清。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。处理脂肪组织时，上层有大量油脂应去除。取澄清的匀浆液进行下一步操作。

3.加入 0.2ml 氯仿，剧烈振荡 15~30s，静置 2~3min。

4.4℃离心，12000g×15min。样品分为三层：底层为黄色有机相，上层为无色水相和一个中间层。RNA 主要在水相中，水相体积约为所用 TRIzol 试剂的 60%。

5.小心吸取上清至一新的 DEPC 处理过的 1.5ml EP 管中（如要分离 DNA 和蛋白质可保留有机相），加入 0.5ml 异丙醇，将管中液体轻轻混匀，室温静置 10min。

6.4℃离心，12000g×10min。离心前看不出 RNA 沉淀，离心后在管侧和管底出现胶状沉淀。

7.弃上清，于沉淀中加入 75%乙醇（冰冷）1ml，振摇，充分洗涤沉淀。

8.4℃离心，12000g×5min。

9.弃上清，短暂离心，小心吸取弃去上清。

10.加入适量（20μl）DEPC（Rnase Free）H<sub>2</sub>O 溶解 RNA（65℃促溶 10~15min）。

11.取 2μl 进行电泳，其余-80℃保存。

## 实验流程图

