

# TRzol LS (液体样本 RNA 抽提试剂)

## TRzol LS Reagent

### 产品信息:

组成	RA102
TRzol LS	50ml×2
氯仿替代物	5ml×2

### 储存条件:

TRzol LS 在室温下能稳定保存 12 个月。尽管如此, 为达到最佳效果, 我们建议保存在 2-8°C 的环境下。氯仿替代物室温避光保存。

### 重要提示:

有毒物接触皮肤或者不慎吞服, 会导致灼伤。一旦接触皮肤后立即以大量的洗涤剂 and 清水清洗。若感不适, 看医生并寻求苯酚和其他成分的正确治疗方案。

### 产品介绍:

TRzol LS 试剂是直接来自细胞或组织中提取总 RNA 的试剂。它在破碎和溶解细胞时能保持 RNA 的完整性。加入氯仿替代物/氯仿后离心, 样品分成水样层、中间层和有机层。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回收。

无论是人、动物、植物还是细菌, 该方法对少量及大量的组织和细胞均有较好的分离效果。TRzol LS 试剂操作上的简单性允许同时处理多个样品。所有的操作可以在一小时内完成。TRzol 抽提的总 RNA 能够避免 DNA 和蛋白的污染, 可用于 RNA 印迹分析、斑点杂交、poly(A)+筛选、体外翻译、RNA 酶保护分析和分子克隆。如果是用于 PCR, 当两条引物位于单一外显子内时, 建议用扩增级的 DNase I 来处理抽提的总 RNA。

### 注意事项:

1. 从少量的组织(1~10mg)或细胞( $10^2$ - $10^4$  个)中分离 RNA 样品: 往组织或细胞中加入 800 $\mu$ l TRzol。待样品裂解后, 加入氯仿替代物并进行步骤 2 中的抽提操作。可在用异丙醇沉淀 RNA 之前, 加入 5~10 $\mu$ g 无 RNA 酶的 glycogen 作为水样层的载体。为降低其黏度在加入氯仿替代物前用 26 号注射器抽吸两次以切断基因组 DNA。Glycogen 会留在水样层中并和 RNA 共析出。在浓缩到 4mg/ml 之前它不会抑制逆转录反应第一链的合成也不会抑制 PCR。

2.在匀浆化后和加入氯仿替代物之前,样品可以在-60°C或者-70°C保存至少一个月。将RNA沉淀溶于75%的乙醇在2-8°C至少可以保存一周,在-5—-20°C下至少可保存一年。

3.用TRzol LS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。如无例外,室温保持在15-30°C的条件下。

### 自备试剂:

异丙醇、75%乙醇(RNase-Free water 配制)、RNase-Free water (将水加入无RNA酶的玻璃瓶中,加入DEPC至0.1%(V/V)。放置过夜并高压灭菌)。

### 操作步骤:

#### 1.样品预处理

##### a.生物液体

每0.25ml液体样品(血清,血浆,脑脊液等等)加入0.75ml TRzol LS,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 TRzol LS。对于含有高污染物样品如全血样品,可以用灭菌水按照1:1比例稀释一倍后开始提取。TRzol LS和液体样品的终体积比总是3:1。

##### b.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TRzol LS。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。

##### c.单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入0.3ml-0.4ml的TRzol LS溶解细胞,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TRzol LS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TRzol LS。

##### d.悬浮生长的细胞

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

##### e.病毒液处理

直接取病毒液,加入3倍体积TRzol LS试剂,充分振荡混匀。

#### 2.分离阶段

将匀浆样品在15-30°C条件下孵育5min以使核蛋白体完全分解。每0.75ml TRzol LS

加0.1ml氯仿替代物。盖紧样品管盖，用手用力摇晃试管15秒并将其在室温下孵育2~15 min。在2~8°C下以不超过12,000×g的离心力高速冷冻离心15 min。离心后混合物分成三层：下层有机层，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TRzol LS 容量的70%。

## 2.RNA 的沉淀

将水样层转移到一干净的试管中，如果希望分离DNA和蛋白，有机层和中间层同样要予以保留。通过将水样层和异丙醇混合来沉淀RNA。每0.75ml TRzol LS对应0.5ml 异丙醇。将混合的样品在15-30°C条件下孵育10min并在2~8°C下以不超过12,000×g的离心力高速冷冻离心10 min。RNA沉淀在离心前通常不可见，离心后会形成一胶状片状沉淀附着于试管壁和管底。

## 3.RNA 的漂洗

移去上层悬液。用75%的乙醇(RNase-Free water配制)洗涤RNA沉淀一次，每0.75ml 的TRzol LS至少加1ml的75%乙醇。旋涡振荡混合样品并在2~8°C下以不超过7,500×g的离心力高速冷冻离心5 min。

## 4.RNA 的再溶解

室温干燥 RNA 沉淀，不要在真空管里离心干燥 RNA。尤为重要，不能让 RNA 沉淀完全干燥那样会极大地降低它的可溶性。部分溶解的 RNA 样品其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值<1.6。用移液管分几次移取 RNase-Free water 来溶解 RNA，溶解后保存在-70°C。