



TRIzol LS 试剂

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100mL
MCR-0002	TRIzol LS 试剂	100 mL
	说明书	1 份

产品简介

默科的 TRIzol LS 试剂是一种即用型试剂，用于在 1 小时内从人类、动物、植物、酵母或细菌来源的细胞和组织样本中提取高质量的总 RNA（以及 DNA 和蛋白质）。

TRIzol LS 试剂是苯酚、异硫氰酸胍和其他专利成分的匀质溶液，可用于提取长链和短链 RNA。TRIzol LS 试剂可在样本匀浆化过程中破坏细胞组分，并抑制 RNA 酶的活性，从而保持 RNA 的完整性。TRIzol LS 试剂可同时处理大量样本，是对 Chomczynski 和 Sacchi 开发的一步法提取 RNA（Chomczynski 和 Sacchi, 1987）的改进。TRIzol LS 试剂能够从同一份样本中顺序提取 RNA、DNA 和蛋白质（Chomczynski, 1993）。采用 TRIzol LS 试剂进行样本匀浆化后，加入氯仿，匀浆物可分成透明的上层水相层（含有 RNA）、中间层和红色的下层有机层（含有 DNA 和蛋白质）。然后用异丙醇从水相层中沉淀出 RNA。用乙醇从中间层/有机层中沉淀出 DNA。利用异丙醇从酚-乙醇上清液中沉淀出蛋白质。沉淀的 RNA、DNA 和蛋白质清洗掉杂质后，重悬进入下游应用。

提取的 RNA 可用于 RT-PCR、Northern Blot 分析、斑点印迹 杂交、poly (A) + 选择、体外翻译、RNA 酶保护分析和分子克隆。

提取的 DNA 可用于 PCR，限制性酶消化和 Southern Blot 分析。

提取的蛋白质可用于 Western Blot 分析，某些酶活性的恢复和一些免疫沉淀实验。

重要说明：TRIzol LS 试剂用于处理液体样本（例如血液和病毒样本）。切勿将未稀释的 TRIzol LS 试剂与固体样品一起使用。用 TRIzol LS 试剂处理固体样品会导致产率降低。TRIzol LS 试剂也可与 Phasemaker 微量离心管配合使用来提取 RNA。完整方案请参阅 TRIzol LS 试剂和 Phasemaker 微量离心管完整系统用户指南。

保存条件

15-30°C 避光保存，有效期 2 年。

注意事项

- 除非另有说明，请在室温（20-25° C）下执行所有步骤。
- 如果起始材料含有高水平的 RNase（RNA 酶），如脾或胰腺样本，请使用冷藏 TRIzol LS 试剂。
- 使用独立包装的一次性无菌塑料制品和不含 RNA 酶的一次性无菌移液器、移液器吸头和离心管。
- 处理试剂和 RNA 样本时需一次性手套，以防止来自皮肤表面的 RNA 酶；经常更换手套，特别是当步骤进行到从操作粗产物转到更纯的产物时。
- 提取 RNA 时应始终遵循适当的无菌操作原则。
- 使用 RNaseZap RNase 去污溶液去除工作台和非一次性物品（如离心机和移液器）表面的 RNA 酶。
- TRIzol LS 试剂与样品的体积比始终保持为 3:1。
- 为了便于从少量样本（<10⁶ 个细胞或 <10mg 的组织）中分离 RNA，或对于 <0.25mL 的样本体积，需使用不含 RNA 酶的水将样本体积调整为 0.25mL。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

裂解样本和分相

1. 向每 0.25 mL 体积样品中加入 0.75 mL TRIzol LS 试剂。

2. 使用移液枪反复吹吸样品几次使样品匀浆化

注：停止点。匀浆后的样本可以在 4°C 下过夜保存或在 -20°C 下保存最长一年。

3.（可选）如果样本的脂肪含量较高，请在 4° C 至 10° C 下 12000×g 离心 5 分钟，然后将透明的上清液转移至新管中。

4. 孵育 5 分钟以使核蛋白复合物完全解离。

5. 每 0.75 mL 用于裂解的 TRIzol LS 试剂中添加 0.2 mL 氯仿，盖紧试管盖子，然后通过摇动彻底混合。

6. 孵育 2-3 分钟。

7. 在 4° C 下 12,000×g 离心 15 分钟。混合物分离成下层的红色苯酚 - 氯仿层、中间层和无色的上层水相。

8. 将含有 RNA 的水相转移至新离心管中。

9. 将新离心管倾斜 45°，将移液头中的含有 RNA 的水相液体打出。

注：避免在吸取水相时吸到中间层和有机相。



注意: 如果您想提取 DNA 或者蛋白质, 请保留中间层和有机相。操作“提取 DNA”或“提取蛋白质”有机相可以在 4° C 过夜保存。

提取 RNA

1. 沉淀 RNA

- (1) 每 0.75 mL TRIzol LS 试剂, 向水相中加 0.5 mL 异丙醇。
- (2) 孵育 10 分钟。
- (3) 在 4° C 下 12,000×g 离心 10 分钟。总 RNA 在试管底部形成白色凝胶状沉淀。
- (4) 使用移液器弃去上清液。

2. 洗涤 RNA

- (1) 每 0.75 mL TRIzol LS 试剂, 用 1 mL 75%乙醇重悬沉淀。
注: RNA 保存在 75%乙醇中, 在-20°C下可以保存至少 1 年, 在 4°C下可以保存至少 1 周。
- (2) 短暂涡旋样本, 然后在 4°C 下 7500×g 离心 5 分钟。
- (3) 使用移液器弃去上清液。
- (4) 将 RNA 沉淀真空干燥或室温晾干 5-10 分钟。

注意: 切勿用真空离心机干燥沉淀。切勿让 RNA 沉淀干燥, 以确保 RNA 的完全溶解。部分溶解的 RNA 样本的 A_{230/280} 比值<1.6。

3. 溶解 RNA

- (1) 用 20-50 μL 不含 RNA 酶的水, 0.1 mM EDTA 或 0.5% SDS 溶液通过反复吹吸将沉淀重新悬浮。
注意: 如果 RNA 会在随后的酶促反应中使用, 则切勿将 RNA 溶解在 0.5% SDS 溶液中。
- (2) 在 55-60° C 的水浴或加热块中孵育 10-15 分钟。

注: 继续下游应用, 或在-70° C 下保存 RNA。

4. 测定 RNA 产量

方法一: 吸光度 (260 nm 处的吸光度反映总核酸质量, 280 nm 处的吸光度反映样本纯度。由于游离的核苷酸、RNA、ssDNA 和 dsDNA 均会在 260 nm 处产生吸收峰, 因此它们共同组成了 260 nm 出的吸光度。)

1. 用不含 RNA 酶的水稀释样本, 然后测定在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度。
2. 使用公式 $A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 = \mu\text{g RNA/mL}$ 计算 RNA 浓度。
3. 计算 A_{260} / A_{280} 比值。比值约等于 2 则认为纯度较高。

注: 可以使用 NanoDrop 分光光度计测定吸光度, 无需提前稀释 RNA。更多信息, 请参阅仪器使用说明书。

方法二: 荧光 (荧光测定值特异性地反映原始 RNA 质量, 不反映蛋白质和其他污染物的含量。)

使用合适的 Qubit™ 或 Quant-iT™ RNA 检测试剂盒定量 RNA 产量。 更多信息, 请参阅试剂盒使用说明书。

下表为各种典型起始材料的 RNA (A_{260/280} >1.8) 产量 (仅供参考)。

起始材料	数量	RNA 产量
人血液	250 μL	2.6-4.0 μg
	1 mL	15-20 μg
人白细胞	7×10 ⁷ 个细胞	60-70 μg
	7×10 ⁸ 个细胞	1109 μg

提取 DNA

从“裂解样本和分相”中得到的中间层和下层酚-氯仿层中提取 DNA。

1. 沉淀 DNA

- (1) 移除覆盖在中间层的任何剩余水相。这对提取的 DNA 的质量至关重要。
- (2) 每 0.75 mL TRIzol LS 试剂添加 0.3 mL 100%乙醇。
- (3) 盖上离心管, 多次颠倒离心管以混合样本。
- (4) 孵育 2-3 分钟。
- (5) 在 4° C 下 2000×g 离心 5 分钟以沉淀 DNA。
- (6) 将苯酚-乙醇上清液转移至新离心管中。

注: 上清液用于蛋白质提取 (如果需要, 请参阅“提取蛋白质”的步骤), 且含有蛋白质的上清液可以在-70° C 下保存数月。

2. 洗涤 DNA

- (1) 每 0.75 mL TRIzol LS 试剂, 用 1 mL 含 0.1 M 柠檬酸钠溶液 (pH 8.5) 的 10%乙醇重悬沉淀。
- (2) 孵育 30 分钟, 偶尔轻轻颠倒以混合样本。
注: DNA 可以在柠檬酸钠/乙醇中储存至少 2 小时。
- (3) 在 4° C 下 2000×g 离心 5 分钟。
- (4) 使用移液器弃去上清液。
- (5) 复步骤 2 (1) - 步骤 2 (4) 一次。

注: 如果 DNA 质量 >200 μg, 重复步骤 2 (1) - 步骤 2 (4) 两次。

- (6) 每 0.75 mL TRIzol LS 试剂, 用 1.5 mL-2 mL 75%乙醇重悬沉淀。
- (7) 孵育 10-20 分钟, 偶尔轻轻颠倒以混合样本。



注: DNA 可在 4° C 的 75%乙醇中储存数月。

(8) 在 4° C 下 2000×g 离心 5 分钟。

(9) 使用移液器弃去上清液。

(10) 将 DNA 沉淀真空干燥或室温晾干 5-10 分钟。

注意: 切勿用真空离心机干燥沉淀。

3.溶解 DNA

(1) 通过反复吹打将沉淀重悬于 0.3-0.6mL 的 8 mM 氢氧化钠中。

注: 我们建议在温和碱性溶液中重悬 DNA, 因为提取的 DNA 在水或 Tris 缓冲液中不能很好地重悬。

(2) 在 4°C 下 12,000×g 离心 10 分钟以移除不溶性物质。

(3) 将上清液转移至新离心管中, 然后根据需要用 HEPES 调整 pH 值。继续下游应用, 或在 4°C 下过夜保存 DNA。若需在 -20°C 下长期保存, 用 HEPES 将 pH 调节至 7-8 并添加 1 mM EDTA。

4.测定 DNA 产量

方法一: 吸光度 (260 nm 处的吸光度反映总核酸质量, 而 280 nm 处的吸光度反映样本纯度。由于游离的核苷酸、RNA、ssDNA 和 dsDNA 均会在 260 nm 处产生吸收峰, 因此它们共同组成了 260 nm 出的吸光度。)

步骤:

(1) 用不含 RNA 酶的水或缓冲液 (pH>7.5) 稀释样本, 然后测定在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度。

(2) 使用公式 $A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50 = \mu\text{g DNA/mL}$ 计算 DNA 浓度。

(3) 计算 A_{260} / A_{280} 比值。比值约等于 1.8 则认为纯度较高。可以使用 NanoDrop 分光光度计测定吸光度, 无需提前稀释 DNA。更多信息, 请参阅仪器使用说明书。

方法二: 荧光 (荧光测定值特异性地反映原始 DNA 质量, 不反映蛋白质和其他污染物的含量。)

步骤: 使用合适的 Qubit™ 或 Quant-iT™ dsDNA 测定试剂盒定量 dsDNA 产量。 更多信息, 请参阅试剂盒使用说明书。

下表为各种典型起始材料的 DNA ($A_{260/280}$ 在 1.6-1.8 之间) 产量 (仅供参考)。

起始材料	数量	DNA 产量
人白细胞	7×10^8 个细胞	1.3 mg

提取蛋白质

从“沉淀 DNA”中的苯酚-乙醇上清液中, 通过“沉淀蛋白质”或“透析蛋白质”来提取蛋白质。

1.沉淀蛋白质

(1) 每 0.75 mL TRIzol LS 试剂, 将 1.5 mL 异丙醇添加到苯酚-乙醇上清液中。

(2) 孵育 10 分钟。

(3) 在 4° C 下 12,000×g 离心 10 分钟以沉淀蛋白质。

(4) 使用移液器弃去上清液。

2.清洗蛋白质

(1) 制备含 0.3 M 盐酸胍的 95%乙醇组成的清洗液。

(2) 每 0.75 mL TRIzol LS 试剂, 用 2 mL 清洗液重悬沉淀。

(3) 孵育 20 分钟。

注: 在清洗液中, 蛋白质在 4°C 条件下可保存至少 1 个月, 或在 -20°C 条件下保存至少 1 年。

(4) 在 4°C 下 7500×g 离心 5 分钟。

(5) 使用移液器弃去上清液。

(6) 重复步骤 2 (2) -步骤 2 (5) 两次。

(7) 加入 2 毫升 100%乙醇, 然后短暂涡旋混匀。

(8) 孵育 20 分钟。

(9) 在 4° C 下 7500×g 离心 5 分钟。

(10) 使用移液器弃去上清液。

(11) 将蛋白质沉淀在室温条件下静置干燥 5-10 分钟。

注意: 切勿用真空离心机干燥沉淀。

3.溶解蛋白质

(1) 通过反复吹打将沉淀重悬于 200 μL 的 1% SDS 溶液中。

注: 为确保沉淀完全重悬, 我们建议您将样本在 50° C 水浴锅或加热块中孵育。

(2) 在 4° C 下 10,000×g 离心 10 分钟以移除不溶性物质。

(3) 将上清液转移至新离心管中。直接继续下游应用, 或在 -20° C 下保存样本。

4.确定蛋白质产率

通过 Bradford 检测测定蛋白质浓度。 **注:** SDS 浓度须<0.1%。

透析蛋白质

1.将苯酚-乙醇上清液装载到透析膜上。

Website URL: www.mo-chem.com

生产商: 上海拜立得生物科技有限公司



注: 苯酚-乙醇溶液可以溶解某些类型的透析膜（例如纤维素酯）。实验开始前请测试透析膜与苯酚-乙醇溶液的兼容性。

2. 在 4° C 条件下，对样品进行 3 次 0.1% SDS 的透析。16 小时后第一次更换 0.1% SDS 溶液，4 小时后（20 小时）第二次更换， 2 小时后（22 小时）进行最后更换。

注: 需要浓度至少为 0.1% 的 SDS 溶液以重新溶解沉淀中的蛋白质。如果需要，可以在溶解后稀释 SDS。

3. 在 4° C 下 10,000×g 离心透析液 10 分钟。

4. 将含有蛋白质的上清液转移至新离心管中。

5. （可选）加入 100 μL 1% SDS 和 100 μL 8 M 尿素溶解沉淀。直接继续下游应用，或在 -20°C 下保存样本。