

高效TRIZOL裂解液 使用说明书

【产品名称】

高效TRIZOL裂解液

货号: HC0868

规格: 100ML

保存条件: RT保存12个月

需要试剂:

氯仿、异丙醇、75%乙醇(用DEPC水配制)、RNase-free水。

操作步骤:

1、样本处理

1)贴壁细胞:吸尽培养液, 每10平方厘米(6孔板孔或35mm平皿)细胞加入1mL 高效TRIZOL裂解液,使其覆盖培养细胞, 再用吸管或加样器吹打2~3次, 细胞应完全裂解, 然后转移至离心管中。

2)悬浮细胞:离心收集细胞, 吸尽液体, 每五百万至一千万(5×10^5 - 1×10^7)动植物或酵母细胞, 或一千万(1×10^7)细菌, 加入1mL高效TRIZOL裂解液。用吸管或加样器吹打, 使其完全裂解。某些酵母和细菌如裂解不充分, 可用匀浆器匀浆, 以确保其完全裂解。转移至离心管中。

3)组织:先将组织剪切成小块, 放入玻璃匀浆器内。冷冻组织可在研钵中研磨匀浆。每50-100mg组织加入1mL 高效TRIZOL裂解液, 匀浆至完全裂解。转移至离心管中。

裂解产物应呈澄清的透明粘稠液体。室温放置5分钟。对于多糖、蛋白等杂质丰富的组织样品, 匀浆后仍会存留有不溶物质, 可 $12000g$ $4^{\circ}C$ 离心10分钟, 然后吸取上清至一新的离心管中。

2、相分离

加入0.2ml的氯仿, 加盖好后用手剧烈摇晃15s, 在 $15-30^{\circ}C$ 放置2-3min, 然后离心 $12,000 \times g$, 15min;离心后分成三层, 取上层水相。RNA只存在于水相中, 水相占总体积的60%。

3、RNA沉淀

将上层水相转移到另一干净的EP管中, 加入0.5ml异丙醇, $15-30^{\circ}C$, 静置10min, 然后 $12,000 \times g$, $4^{\circ}C$ 离心10min。离心前可以在管的侧壁和底部看到絮状胶样沉淀, 这就是RNA沉淀。

4、RNA洗涤

去上清, 加入1ml75%乙醇洗涤RNA沉淀, 振荡器混匀, $7,500 \times g$, $4^{\circ}C$ 离心5min。

5、RNA再溶解

去上清，置真空或空气中5-10min，干燥RNA沉淀。注意不能将RNA沉淀完全干燥，这样会极大地降低它的溶解度。部份溶解的RNA样品其A260/280比值 <1 。用无RNase水或0.5%SDS溶液重悬RNA沉淀，用枪头反复吹打几次，55-60°C，静置10min。测浓度后-20°C保存。

6、测浓度

取2 μ l储存液加入另一个EP管中,再加入98ul无RNase水,离心混匀,以无RNase水作空白对照,测OD260/280值。OD260/280值在1.8-2.0视为纯度很高。·一般浓度在1000ng/ul较准。浓度太高要稀释以后再测定。·RNA鉴定:琼脂糖电泳,确定抽提RNA完整性和DNA污染情况。

注意事项:

在使用高效TRIZOL裂解液的时候要带手套和眼罩，避免接触到皮肤和衣服，使用化学通风橱，防止蒸汽吸入。

除非特别说明，所有的操作均在15-30°C下进行，所用的试剂均放置于15-30°C。

组织在加入氯仿之前是可以在-60至-70°C放置一个月。RNA沉淀在75%乙醇中在2至8°C下至少可以放置一周，在-5至-20°C至少可以放置一年。