

TRI reagent

RNA / DNA / 蛋白質 三效分離試劑

中文操作說明 (RNA 純化)

基本原理：

TRI reagent 是一種新型 total RNA 抽取試劑，內含異硫氰酸胍等物質，能迅速破碎細胞，抑制細胞釋放出的核酸酶。並可依實驗需要，從同一樣本中純化出 RNA/DNA/蛋白質。可搭配層析試劑 BCP(BP 151)取代氯仿的毒性危險。

準備工作：

1. 實驗器材處理

- a. 塑膠製品：儘可能使用一次性無菌塑膠製品。已標明 RNase-free 的塑膠製品，如沒有開封使用過，通常不需再處理。處理方法如下：
 - ❖ 在玻璃燒杯中注入去離子水，加入 DEPC 使其終濃度為 0.1%。
注意：DEPC 為活性很強的劇毒物，須在通風櫃中小心使用。
 - ❖ 將待處理的塑膠製品放入一個可以高溫滅菌的容器中，注入 DEPC 水溶液，使塑膠製品的所有部分都浸泡到溶液中，在通風櫃中 37°C 或室溫下處理過夜。
 - ❖ 將 DEPC 水溶液小心倒入廢液瓶中，將裝有 DEPC 水處理過的塑膠製品的容器以鋁箔封口，高溫高壓蒸汽滅菌至少 30 分鐘。
 - ❖ 滅菌塑膠製品在合適的溫度(80°C)下烘烤乾燥。置潔淨處備用。
- b. 玻璃和金屬物品：
 - ❖ 以 DEPC 水處理或 250°C 烘烤 3 小時以上。

2. 試劑準備

- a. RNA 純化
 - ❖ 均質化：TRI Reagent
 - ❖ 層析：BCP 或 chloroform
 - ❖ 沈澱與清洗：100% isopropanol, 75% ethanol (用 DEPC 水配製)
 - ❖ 回溶：FORMAZOL, 或 0.5% SDS 或 DEPC water
- b. DNA 純化
 - ❖ 純化：100% Ethanol
 - ❖ 清洗：0.1M trisodium citrate in 10% ethanol, 75% ethanol
 - ❖ 回溶：8mM NaOH
- c. 蛋白質純化
 - ❖ 純化：Acetone
 - ❖ 清洗：wash solution (0.3M guanidine hydrochloride in 95% ethanol + 2.5% glycerol)
 - ❖ 回溶：1%SDS 或 10M urea 或其他適用試劑

RNA 純化操作步驟：**1. 均質化**

a. 軟組織：將組織先剪碎，再與 TRI reagent 共同置於鐵氟龍研磨管或電動均質機中研磨。

❖ 使用均質機時組織體積不可超過試劑體積的 10%。

b. 硬組織：在液態氮中將組織碾磨成粉末，趁液態氮尚未揮發時，移到 1.5 ml 離心管中。再加入 TRI reagent

c. 細胞：貼附型細胞 10 cm² 的培養皿，以 BPS 清洗後加入 1ml TRI reagent；靜置數分鐘後刮取。懸浮型細胞計算細胞數，離心去上清液。每 5~10 x 10⁶ 個細胞加入 1ml。

d. 樣品的用量參見附表。

❖ 樣品量甚少時(組織<10mg；細胞數<10⁶)，可減少試劑用量(0.8ml)，並加入 Polyacryl Carrier (PC 152) 2~8 ul 用 tip 反復抽吸混勻，或劇烈振盪(vortex)使其混合均勻。

❖ 其他樣品請改用 TB126 TRI Reagent BD (全血或血漿)

TS120 TRI Reagent LS (細胞或細菌培養液)

❖ 若樣本為富含蛋白質或脂肪、多細胞間質的肌肉組織、含大量澱粉的植物塊莖或塊根。在均質化後可先以 12,000g，4°C 離心 10 分鐘。移除油脂(可能為浮在上層的不透明物)及沈澱物，只取透明不混濁的部分移至新的微離心管中；再進行分層操作。

❖ 均質化後(移除雜質後，加入層析劑前)可儲存於-70°C 一個月。

樣品	每 ml 試劑 加入樣品量
培養細胞	5~10×10 ⁶
動物組織	50mg
細菌	1×10 ⁷
酵母	1×10 ⁷
植物組織	100mg
絲狀真菌	100mg

2. 分層

a. 室溫下靜置五分鐘後將混合液樣品轉移到無菌的微離心管中。加入 100μl 的 BCP (TRI reagent 原始用量的十分之一)，劇烈振盪混勻 15 秒後靜置 2~15 分鐘。

❖ 若使用氯仿(chloroform)，用量為 TRI reagent 原始用量的五分之一。

❖ 使用 BCP 的效果及安全性皆優於氯仿。

b. 以 12,000g，4°C 離心 15 分鐘。會分成三層，上層是透明的水層、中間層、下方紅色的有機層。RNA 在水層、DNA 及蛋白質位於中間層與有機層。水層體積大約是 TRI reagent 用量的 60%

❖ 注意！！若離心步驟未控溫，DNA 可能會混入水層中，且 RNA 產物不適於後續進行 PCR 相關實驗！

3. RNA 沈澱

a. 將上清液小心轉移到無菌 1.5-ml RNase-free 離心管裏。將中間層與有機層存放於 4°C 可再純化 DNA 及蛋白質。

b. 加入 TRI Reagent 用量一半的 isopropanol，混合均勻。

❖ 富含多醣類或醣蛋白的樣本(例如大多數的植物組織)，可將分離的水層加入四分之一 TRI Reagent 用量的 isopropanol，然後加入四分之一的高鹽純化液(PS 161 或 0.8M sodium citrate + 1.2M NaCl)。可使多醣類或醣蛋白溶解。

c. 室溫靜置 5~10 分鐘後，以 12,000g，4°C 離心 8 分鐘。RNA 會呈現膠狀或白色沈澱。

4. RNA 清洗

a. 移除離心後的上清液，加入 1 ml 的 75%乙醇震盪。

❖ 保持在 75%乙醇內，可儲存於 4°C 一週或零下 20°C 一年。

b. 以 7,500g，4°C 離心 5 分鐘。(如果 RNA pellet 會浮起，則以 12,000g 離心)

5. RNA 回溶

- a. 將乙醇小心的移除，並室溫下自然乾燥 3~5 分鐘，但不可讓 RNA 徹底的乾燥，否則會不易回溶。(不建議使用抽氣離心機乾燥)
 - ❖ 若 RNA 將回溶於 FORMAzol (FO-121)中，則不需乾燥步驟。
- b. 以適量的 FORMAzol 或經 DEPC 處理之 0.5% SDS、純水回溶，用 tip 輕輕吸放數次並置於 55~60°C，10~15 分鐘。

6. RNA 的分析和定量

- a. 以分光光度計測試 260 與 280nm 的吸光值，OD_{260/280} 的比率需在 1.6~1.9。
- b. 1 OD₂₆₀ ≙ 40 µg RNA，可估算 RNA 產量。
 - ❖ 注意！！若 RNA 溶液 pH<7.0 可能會造成誤判！

疑難解析：

問題	原因	解決方法
純度不理想	樣品量太多，吸取上清液時吸到有機物和中間層	降低樣品用量或提高試劑用量，小心操作。或均質化後增加初步離心步驟。
微量 DNA 污染	DNA 未能完全進入有機相	離心時注意控溫。降低樣品用量或提高試劑用量，RNase-free 的 DNase I 處理。
RNA 降解	RNase 污染或樣品保存不當	嚴格按要求操作，注意實驗環境與器材清潔；用新鮮材料

儲存方式：

於 4~25°C 可儲存兩年以上。實驗經常性使用可置於室溫。

安全注意：

本產品對細胞、生物組織有腐蝕性。不慎接觸時請以大量清水沖洗。

儲存與操作時須遠離高熱與火源。

相關試劑：

- TB 126 TRI Reagent BD
- TS 120 TRI Reagent LS
- BP 151 BCP – Phase Separation
- FO 121 FORMAzol
- PC 152 Polyacryl Carrier
- PS 161 High Salt Precipitation Solution