**Trizol法提取总RNA**

1. 样品处理：
   1. 培养细胞：收获细胞1~5×107，加入1mlTrizol（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℃及液氮中保存的组织均可）置1.5mlEP管中，加入1mlTrizol充分匀浆，室温静置5min。
2. 可选步骤：
   1. 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2-8℃10000×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1.5mlEP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（RnaseFree）H20溶解RNA（65℃促溶10~15min）。
11. 取2μl进行电泳，其余-80℃保存。