

BiozolRNA 提取试剂简明说明书 (BW-R1020)

产品简介

Biozol Reagent 可从各种真核培养细胞, 动物组织, 细菌、植物和真菌中快速高效提取总 RNA, 整个实验可控制在 30 分钟内。通常情况下可单次处理 1×10^6 个真核细胞, 1×10^9 个细菌细胞, 100 mg 动物或植物组织。如果你要进行全血 RNA 提取的话, 可以使用本试剂盒, 不过我们建议使用 Ezgene™ Blood RNA Kit (Catalog# R6411) 这个专门设计来用于全血 RNA 提取的试剂盒, Ezgene™ Blood RNA Kit 可以很好的溶血, 并去除血红蛋白, 提高 RNA 的得率。

本试剂盒纯化的 RNA 可用于 RT-PCR, Northern 杂交, mRNA 纯化, 体外翻译等下游实验。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Biozol Reagent	5 mL	100 mL	5×100 mL
User Manual	1	1	1

注: Biozol Reagent 含有异硫氰酸胍和苯酚, 请小心实验。

原理

当细胞或组织经 Biozol Reagent 裂解后, Biozol Reagent 内的成分可抑制 RNase 活性。当加入氯仿后, 裂解液分为水相和有机相。RNA 存在于水相中。当用异丙醇处理水相后, 用 75%乙醇洗涤, 室温或真空干燥, 经 DEPC-treated ddH₂O 溶解可获得高质量的 RNA。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。Biozol Reagent 保存于 4°C。

使用前须知

- 当进行 RNA 实验时, 请佩戴一次性手套, 使得 RNase 污染降到最低, 当使用 Biozol Reagent 时, 请使用 RNase-free 的吸管、枪头。操作过程中, 尽可能小心且快速进行。
- 实验前, 请确认正确的起始用量, 至多使用 100 mg。对于 RNA 含量高的样品, 建议使用 30 mg 的组织。对于 RNA 含量低的样品, 建议使用至多 100 mg 的起始材料。

实验前需准备的材料

- 异丙醇
- 氯仿
- 乙醇

组织的均质化

A. 液氮研磨

立即将样品浸没在液氮中冷冻, 然后在液氮作用下研磨成粉末。将悬浮物转移至预冷的离心管, 请将离心管置于液氮中预冷, 否则悬浮液会沸腾, 造成样品损失。当液氮完全蒸发, 请在样品融化前加入 Biozol Reagent。

B. 匀浆机匀浆

匀浆仪可有效地将大多数组织均质化, 大多匀浆仪使用不同大小的探针或发生器, 可在离心管中处理小体积样品。

C. 注射器法

大分子量的 DNA 增加了裂解液的粘度, 可通过 19-21 目的窄针将其粉碎。

操作步骤

A. 真核细胞和组织

1. 加入 **1 mL Biozol Reagent**, 裂解细胞和组织。

注: 1 mL 的 Biozol Reagent 可处理 10^7 个细胞或 100 mg 组织。

- **单层培养细胞 (成纤维细胞、内皮细胞等)**

去除培养基, 直接向培养基加入 **1 mL Biozol Reagent**, 裂解细胞。上下吹吸几次使其均质化, 将裂解液转移至一个干净的 1.5 mL RNase-free 的离心管。

- **悬浮培养细胞**

1,500 rpm (400 ×g) 以下的转速离心 5 min, 弃上清液, 加入 **1 mL Biozol Reagent**, 上下吹吸几次以均质化, 转移至一个干净的 1.5 mL RNase-free 的离心管。

- **组织样品**

根据说明书要求确定样品的使用量以及均质化方法, 除非用到液氮, 否则直接加入 **1 mL Biozol Reagent**, 进行步骤 2。对于特殊样品例如肝、脾、骨、软骨等, **Biozol Reagent** 的使用量按需增减。

2. 室温孵育 2 min。

3. 加入 0.2 mL 氯仿 (每 1 mL Biozol Reagent), 盖好盖子并剧烈摇晃 15 s。

- 12,000 ×g, 4°C, 离心3 min。混合液分成下层苯酚-氯仿相、中间相和上层水相。RNA存在于水相中。
- 转移不超过80%的水相至一个新管，加入0.5倍体积的异丙醇（96-100%，室温），最大速度涡旋15 s。
- 12,000 ×g, 4°C, 离心10 min，离心后管底产生沉淀，弃上清。
- 沿管壁轻轻加入1 mL 75%乙醇重悬沉淀，轻柔摇晃管子洗涤沉淀。7,500 ×g离心5 min，弃上清，尽可能除去残留乙醇，以降低盐离子污染。
- 重复步骤7。
- 真空或室温干燥 RNA 沉淀 5-10 min。加入 **30-50 μL** DEPC-treated ddH₂O，溶解RNA，储存于-80°C。

B. 细菌

- 收集菌体，加入**100 μL TE/Lysozyme**，室温静置7 min。

注: 4°C, 4,000 ×g 离心 5 min 离心 10⁹个细胞。弃上清，加入 **100 μL TE buffer**（含有 lysozyme）（革兰氏阴性菌：**0.5 mg/mL**；革兰氏阳性菌：**4 mg/mL**）。完全重悬细胞，室温静置 7 min。

- 加入**1 mL Biozol Reagent**，涡旋混匀15 s。室温孵育3 min。
- 加入0.2倍体积的氯仿（每加入1 mL Biozol Reagent），小心盖上盖子，涡旋15 s。
- 12,000 ×g, 4°C, 离心3 min，混合液分成下层苯酚-氯仿相、中间相和上层水相。RNA存在于水相中。
- 转移不超过80%的水相至一个新管，加入0.5倍体积的异丙醇（96-100%，室温），涡旋15 s。这一步可能形成沉淀，不影响RNA纯化。

- 12,000 ×g, 4°C, 离心10 min，离心后管底产生沉淀。

- 按照细胞RNA提取步骤**7-9**进行后续实验。

DNA 污染

RNA Mini Column 可以去除绝大多数的 DNA，而不需要 DNase 处理。然而，一般的 RNA 提取都不能完全去除基因组残留。对于下游敏感实验如：RT-PCR 或差异显示，我们建议在膜上进行 DNA 消化（OBI cat#E1091）或使用 RNase-free 的 DNase 来进行消化。对于 RT-PCR，使用内含子跨越引物，使其易于识别 DNA 污染。以 RNA 为模板的对照 PCR 允许 DNA 污染。设计内含子插入的引物，请拨打热线 400-115-2855，我们这里提供体外引物的构建合成。

RNA 的定量和存储

测定 260 nm 和 280 nm 的吸光值可以测定 RNA 的浓度。260 nm 处 1 个 OD 值表示溶液 RNA 浓度是 40 μg/mL，DEPC 水呈酸性，会显著降低 260 nm 的吸光值。我们建议使用 TE 缓冲液来稀释 RNA 进行 OD 值的测定。纯净的 RNA 的 OD A₂₆₀ /A₂₈₀ 比值是 2.0。纯净的蛋白质 OD A₂₆₀ /A₂₈₀ 的比值是 0.6 左右。比值在 1.8-2.0 之间的话表示 RNA 纯度是 90%-100%。（苯酚的最高吸光值在 275 nm，会影响 DNA 和 RNA 的吸光值，但是 EZgene™ Total Biozol RNA 提取试剂解决了苯酚对吸光值的影响。）RNA 溶于水后储存于-80°C。按照上面的方法提取的 RNA 可保存超过一年。

RNA 质量

强烈建议在进行所有的分析前先测定 RNA 的质量。变性琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色可评估 RNA 的质量。凝胶上应出现两条带 28S 和 18S（细菌为 23S 和 16S）。如果这些条带不清晰并倾向于形成小分子 RNAs，这种情况说明在原料准备或操作过程或储备中 RNA 发生了很严重的降解。小于 200 碱基片段的 RNA 不能有效的结合到 RNA 柱子上。当使用大量细胞时，第三条 RNA 条带即 tRNA 条带可能会可见。

常见问题解答

问题	可能原因	改进建议
少量或没有 RNA 沉淀下来	特殊样品组织，极度分化、含细胞数量太少。	<ul style="list-style-type: none"> 再次洗脱 洗脱前对 DEPC-水预热到65°C 离心前柱子在65°C预热 10 min 样品不新鲜，RNA 已全部降解
	操作过程中 RNA 的丢失	<ul style="list-style-type: none"> 实验尽量快速小心 实验器具保证 RNase-free
杂质过多	裂解不充分	<ul style="list-style-type: none"> 完全裂解溶液 减少起初样品量 取上清液时尽量不要吸到中间相
RNA 降解	样品来源	<ul style="list-style-type: none"> 尽快用液氮冷冻样品 尽量使用新鲜样品提取 RNA，或尽快裂解样品。 尽可能按照说明书进行操作，快速操作。
	RNase 污染	<ul style="list-style-type: none"> 操作中减少 RNase 污染 检查缓冲液是否有 RNase 污染
下游实验问题	过多的盐分	<ul style="list-style-type: none"> 用75%乙醇再一次洗涤 每次用75%乙醇洗涤后，尽量去除残留75%乙醇 离心管壁也尽量用75%的乙醇洗涤
DNA 污染	吸到中间相	75°C 下，用 RNase-free DNase I 消化 5 min

杭州倍沃医学科技有限公司

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

market@beiwobiomedical.com