

## Biozol RNA 小提试剂简明说明书 (BW-R7311)

### 产品简介

本试剂盒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, 高达 100 µg。通常情况下可单次处理  $1 \times 10^6$  个真核细胞,  $1 \times 10^9$  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, poly A<sup>+</sup> RNA (mRNA) 纯化, 体外翻译等下游实验。

### 产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
RNA Mini Columns	10	50	250
2 mL Collection Tubes	10	50	250
Biozol Reagent	11 mL	55 mL	300 mL
Buffer RB	9 mL	45 mL	225 mL
RNA Wash Buffer*	3 mL	24 mL	3 x 24 mL
DEPC-treated ddH <sub>2</sub> O	2 mL	10 mL	50 mL
DNase I (2 U/µL, Optional) *	60 µL	300 µL	1500 µL
DNase Stop Buffer (Optional) *	0.5 mL	2.4 mL	12 mL
1.5 mL RNase-free Microfuge Tubes	10	50	250
User Manual	1	1	1

\*: 加入 12 mL (BW-R7311-00) 或 96 mL (BW-R7311-01) 或

3x96 mL (BW-R7311-02) 100%乙醇至 RNA Wash Buffer。

\*: DNase I (Cat#D001) 可向 BEIWO 单独购买。

### 原理

该试剂盒采用了可逆核酸吸附的材料作为吸附柱, 将 Biozol 试剂的高效裂解效率同 OBI 创新 ezBind 技术结合, 该试剂盒可从不同来源的样品特别是脂肪组织如大脑提取 RNA。特别定制的高盐缓冲液可至多吸附 100 µg RNA (200 个碱基以上)。加入氯仿后, 经离心, 溶液分层水相和有机相。RNA 存在于水相中, 可通过乙醇和 RNA Mini Column 提取到。高质量的 RNA 最终通过 DEPC-treated ddH<sub>2</sub>O 洗脱。

### 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, 其他试剂和用品请于室温 (4-28°C) 储存。

### 使用前须知

- 加入 12 mL (BW-R7311-00) 或 96 mL (BW-R7311-01) 或 3x96 mL (BW-R7311-02) 100%乙醇至 RNA Wash Buffer。
- **可选:** 使用前, 加入 800 µL (BW-R7311-00) 或 9.6 mL (BW-R7311-01) 或 48 mL (BW-R7311-02) 100%乙醇至 DNase Stop Buffer。
- 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 样品。RNA Mini Column 的最大结合力为 100 µg。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

### 组织的均质化

#### A. 液氮研磨

使用液氮时请佩戴手套并小心。切下组织, 立即将样品浸没在液氮中冷冻, 然后在液氮作用下于陶瓷研钵研杵研磨成粉末。将悬浮物转移至预冷的 15 mL 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**。这是组织样品的首选破碎方法。

#### 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，进行步骤**2**。

- **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。

4. 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。

5. 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。

6. 加入不超过**700 μL**的混合液至一个**RNA Mini Column**（步骤5中异丙醇的加入可能形成沉淀，涡旋并将所有混合液转移至柱子内）。10,000 ×g离心30-60 s，弃滤液，重复利用收集管。

7. 重复步骤**6**，将剩余样品转移至柱子，按照上一步方法离心。

8. 将柱子置于**2 mL Collection Tube**，加入**400 μL**的**Buffer RB**，按之前描述的离心，弃滤液，重复利用收集管。若需要膜上消化DNA，进行步骤**9**，否则进行步骤**10**。

## 9. 可选：DNase I消化

因为RNA树脂和柱子技术确实去除了大部分DNA，所以大多下游实验不必进行DNase消化。然而，对于敏感的RNA应用可能需要进一步去除DNA，请按以下方式去除DNA：

A. 对于每一个**RNA Mini Column**，按下面准备DNase I消化：

1× DNase I Buffer	46.5 μL
RNase-free DNase I (2 U/μL)	3 μL
Total volume	50 μL

**注：**

- DNase I对物理变性非常敏感，请勿涡旋混匀。轻柔颠倒混匀。RNA纯化前，准备DNase I消化反应。
- DNase I Buffer与DNase I一起提供。
- 标准的DNase Buffer不兼容膜上消化。

B. 加入50 μL上述反应液至**RNA Mini Column**，确保加入膜上。若反应液加入到管壁上或柱圈上，DNase I消化会不充分。

C. 室温（15-25°C）孵育15 min。

D. 加入200 μL DNase Stop Buffer，至少静置5 min，按上述离心，弃滤液。

E. 将柱子置于收集管，加入**400 μL Buffer RB**，按上述离心，弃滤液。

10. 将柱子置于同一个**2 mL Collection Tube**，加入**600 μL RNA Wash Buffer**，按上述描述离心，弃滤液，重复使用收集管。

11. 加入**600 μL RNA Wash Buffer**，按上述描述离心，弃滤液，重复使用收集管。

12. 最大转速（13,000 ×g）离心2 min，完全干燥膜。

13. 转移柱子至一个干净的**1.5 mL RNase-free Microfuge Tube**。

加入**30-50 μL DEPC-treated ddH<sub>2</sub>O**，溶解RNA，室温静置2 min，最大转速离心1 min。

**可选：**将洗脱下来的RNA二次上柱洗脱。

## B. 细菌

1. 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 10<sup>9</sup> 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。

2. 加入**1 mL Biozol Reagent**，涡旋混匀15 s。室温孵育3 min。

3. 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。

4. 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。

5. 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。

6. 加入不超过**700 μL**的混合液至一个**RNA Mini Column**（步骤5中异丙醇的加入可能形成沉淀，涡旋并将所有混合液转移至柱子内）。10,000 ×g离心15-30 s，弃滤液，重复利用收集管。

7. 重复步骤**6**，将剩余样品转移至柱子，按照上一步方法离心。

8. 按照细胞RNA提取步骤**8-13**进行后续实验。

## 操作步骤（负压/离心法）

1. 根据制造商说明准备真空负压装置, 连接 **RNA Mini Column**。
2. 将第 5 步的样品加到 **RNA Mini Column**。
3. 打开负压装置, 使得混合液通过柱子, 关闭负压装置。
4. **可选:** 若下游实验对 DNA 敏感, 可进行 DNase I 消化步骤。
5. 加入 **400 μL Buffer RB**, 打开负压装置, 使得溶液通过柱子, 关闭负压装置。
6. 加入 **600 μL RNA Wash Buffer** (使用前请按要求加入乙醇) 打开负压装置, 使得溶液通过柱子, 关闭负压装置。
7. 重复步骤 6。
8. 将柱子插入 **2 mL Collection Tube**, 转移柱子至一个离心管, 最大速度离心 2 min 干燥柱子。
9. 转移柱子至一个干净的 **1.5 mL RNase-free Microfuge Tube**。加入 **30-50 μL DEPC-treated ddH<sub>2</sub>O**, 溶解 RNA, 室温静置 1-2 min, 最大转速离心 1 min。

## DNA 污染

**RNA Mini Column** 可以去掉绝大多数的 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 A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub> 比值是 2.0。纯净的蛋白质 OD A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub> 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™ 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"> <li>● 再次洗脱</li> <li>● 洗脱前对 DEPC-水预热到 65°C</li> <li>● 离心前柱子在 65°C 预热 10 min</li> </ul>
	柱子过载	减少起始样品量
柱子堵塞	均值化不完全	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 完全均值化样本</li> <li>● 增加离心时间</li> <li>● 减少起始样本量</li> </ul>
RNA 降解	样品来源	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 尽快用液氮冷冻样品</li> <li>● 尽量使用新鲜样品提取 RNA, 或尽快裂解样品。</li> <li>● 尽可能按照说明书进行操作, 快速操作。</li> </ul>
	RNase 污染	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 操作中减少 RNase 污染</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>● 检查缓冲液是否有 RNase 污染</li> </ul>
下游实验问题	过多的盐分	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 确保 RNA Wash Buffer 按要求稀释</li> <li>● RNA Wash Buffer 必须在室温下保存和使用</li> <li>● 用 75% 乙醇再一次洗涤</li> </ul>
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](http://www.beiwobiomedical.com)

400-115-2855

[market@beiwobiomedical.com](mailto:market@beiwobiomedical.com)