

RNAzol (总 RNA 提取试剂)

产品简介:

本品 RNAzol 可以从动物组织、植物材料、各种微生物、培养细胞等中提取 Total RNA。样品在 RNAzol 中能够充分被裂解，在加入氯仿离心后，溶液会形成上清层、中间层和有机层（鲜红色下层，含有蛋白质、多糖、脂肪酸、细胞碎片和少量 DNA），RNA 分布在上清层中，收集上清层，注意不要收集中间层，经异丙醇沉淀便可以回收得到 Total RNA。使用 RNAzol，Total RNA 的提取过程可在 1 小时内完成。提取的 Total RNA 纯度高，很少含蛋白质及基因组 DNA，可以直接用于 Northern 杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RT-PCR 等各种分子生物学实验。如果用于 RT-PCR 实验，即使有少量的基因组 DNA 也会影响实验结果，因此，实验前应使用 DNase I (RNase-free) 进行处理。

RNA 提取实验前的准备:

- 1--氯仿 (CHCl₃)，异丙醇，75%乙醇 (RNase-free)，DNase/RNase-Free 去离子水。
- 2--尽量使用一次性塑料器皿。使用高温高压灭菌后的离心管或用于微量移液器的枪头。若使用玻璃器皿等，应进行 160°C 干热灭菌 2h。不能进行干热灭菌的器皿，需用 0.1% DEPC(焦碳酸二乙酯) 水溶液在 37°C 下处理 12h，然后在高温高压灭菌以除去残留的 DEPC。RNA 实验用的器具建议专门使用，不要用于其他实验。
- 3--使用的无菌水须用 0.1% 的 DEPC 处理后再进行高温高压灭菌。如果使用的试剂不能高温高压灭菌，请使用高压灭菌后的仪器盛装，无菌过滤后使用。
- 4--请使用一次性塑料手套和口罩进行所有试剂配置和实验操作，以避免 RNase 的污染。

实验操作:

样品量	RNAzol 使用量 (mL)
10cm ² 的贴壁培养细胞	1-2
5x10 ⁶ -1x10 ⁷ 的非贴壁培养细胞	1
100μL 的白细胞	2
50-100mg 的组织样品 (易提取 RNA)	1
50-100mg 的组织样品 (不易提取 RNA, 如肝, 脾, 骨及软骨等)	2
15-30mg 的植物材料 (多糖和多酚含量不高的)	1
2-5x10 ⁷ 的酵母细胞	1



1--实验样品的研磨和匀浆。

A,贴壁培养细胞---a, 倒出培养液, 用 1xPBS 清洗 1 次。

b, 每 10cm² 生长的培养细胞中加入 1-2mL 的 RNAzol, 轻微晃动, 确保使裂解液均匀分布于细胞表面。注意: 对于贴壁牢固的培养细胞可用细胞刮刀玻璃细胞。

c, 将内含细胞的裂解液转移至离心管中, 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。

d, 室温 (15-30°C) 静置 5min, 然后从核蛋白中分离 RNA。

B,悬浮培养细胞---a, 将悬浮培养细胞连同培养液一起倒入离心管中, 8,000×g 4°C 离心 2 分钟, 弃上清, 注意不要破坏细胞沉淀。

b, 向每 5×10⁶ 个细胞中加入 1 mL 的 RNAzol。

c, 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。

d, 室温 (15-30°C) 静置 5 分钟, 然后从核蛋白中分离 RNA。

C,动物组织, 植物材料样品

a, 将超低温冻结的 RNA 提取样品称量后迅速转移至用液氮预冷的研钵中, 用研杵研磨组织, 期间不断加入液氮, 直至研磨成粉末状 (如果没有研磨彻底会影响 RNA 的收率和质量), 可以向研钵中加入与样品匀浆量匹配的适量的 RNAzol。对于新鲜的组织样品, 立即加入 RNAzol, 充分匀浆。

b, 将匀浆液转移至离心管中, 室温(15-30°C) 静置 5min。

c, 12000×g 4°C离心 5min。

d, 小心吸取上清液, 移入新的离心管中 (切勿吸取沉淀)。

2-Total RNA 的提取

Proandy 公司推出了一款独特的产品—Phase Lock Gel(PLG), 只需将酚氯仿和样品的混合物加入预装有 PLG 的管子里, 在离心力的作用下, 由于密度不同, 在有机相和水相之间形成致密的固相, 成为保护核酸免受有机相污染的有效屏障。

注: Phase Lock Gel(PLG) 只适用于和 RNAzol 搭配做 RNA 提取, 并不适用于常规组织基因 DNA 提取。**PLG 必须保存在室温, 不可冷冻。**

a, 向匀浆裂解液中加入氯仿 (RNAzol 的 1/5 体积量), 盖紧离心管盖, 混合至溶液乳化呈乳白色。室温静置 5min。

b, 将 a 步骤中的混合液转移至预装有 PLG 的管子里。



c, 12000×g 4°C离心 15min, 从离心机中小心取出离心管, 此时匀浆液分为三层, 即: 无色的上清液 (含 RNA), 中间的 PLG 凝胶, 下层是带有颜色的有机相。

d, 此时可轻松吸出或倒出全部水相转移至另一新的离心管中。

e, 向上清中加入 0.5-1 倍 RNAzol 体积的异丙醇, 上下颠倒离心管充分混匀后, 室温下静置 10min 。

f, 12000×g 4°C离心 10min, 一般在离心后, 试管底部会出现 RNA 沉淀。

3-RNA 沉淀的清洗:

小心弃去上清, 切勿触及沉淀, 残留少量异丙醇没有关系, 加入与 RNAzol 等量的 75%乙醇, 轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁, 7500×g 4°C离心 5min 后小心弃去上清, 切勿触及沉淀。

4-RNA 的溶解。

打开离心管盖, 室温干燥沉淀几分钟, 沉淀干燥后, 加入适量的 DNase/RNase-Free 去离子水溶解沉淀。注意: 不可以离心或加热干燥, 否则 RNA 将会很难溶解。

RNA 纯度分析

1. 用琼脂糖凝胶电泳 (1%琼脂糖+溴乙锭) 分析按以上方法提取获得的 1-2 μg 热变性 total RNA。对于没有降解的 RNA 可能是 2 种 核糖体 RNA (真核细胞: 28S 和 18S), 条带亮度约为 2:1。但如果核糖体 RNA 条带弥散, 可能 RNA 已降解。此外, 如果条带大小超过 28S, 可能存在基因组 DNA 污染, 建议使用 DNase I 处理。

2. 吸光度分析: 用 TE Buffer 稀释 RNA 后测定吸光度, OD260/OD280 比值在 1.7-2.1 为好。例: RNA 浓度计算方法: RNA 浓度 (μg/μl) = (OD260-OD320) ×稀释倍数×0.04

保存温度: 4°C避光保存。

