

BIOZOL 总 RNA 提取试剂

试剂盒组成

货号	BSC51S1	BSC51M1
BIOZOL-total RNA Extraction reagent	30 ml	100 ml
说明书	1 份	1 份

储存与运输条件

- ✎ BIOZOL 试剂 2-8℃ 保存 12 个月, 为达到最佳使用效果, 建议避光保存, 室温环境下, 可以保存一段时间不会影响品质;
- ✎ 可在常温下运输。

介 绍

BIOZOL 试剂是我公司自主开发的总 RNA 提取试剂, 可直接用于人类、动物、植物、细菌等细胞或组织中的总 RNA 提取。样本在 BIOZOL 中充分裂解后加入氯仿离心, 形成上清层、中间层和有机层, 然后通过收集水样层, 用异丙醇沉淀来得到 RNA。

BIOZOL 试剂操作简便易行, 可以同时处理多个样品, 得到高质量的 RNA。纯化的 RNA 可以直接用于 RNA 印迹分析、斑点杂交、poly(A)+ 选择、体外翻译、RNA 酶保护分析 RT-PCR 分析、构建 cDNA 文库等 RNA 研究。

注意事项

RNA 酶是导致 RNA 降解最主要的物质, 其活性很难被完全抑制, 并广泛存在于人体皮肤、吐沫和各种物体的表面等, 所以, 预防其污染, 在 RNA 提取过程中是十分必要的, 抽提 RNA 过程中任一环节的不正确操作都可能导致 RNA 酶的污染。实验前请仔细阅读使用手册, 已达到最好的提取效果:

- ◆ 全程佩戴手套、口罩, 以防 RNA 降解;
- ◆ 使用无 RNA 酶的器皿和吸头抽提 RNA;
- ◆ 器皿和吸头的无 RNA 酶处理, 可使用如下方法: 金属制品洗净, 在 150℃ 烤箱中烘烤 6~8 小时。玻璃制品和塑料器皿及吸头可以用 0.1% (v/v) 的焦碳酸二乙酯 (DEPC) 的水溶液于 37℃ 浸泡 2 小时或常温浸泡过夜 (12 小时), 甩干后, 然后在 151bf/in² (1.034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸汽灭菌 20 分钟, 最后于 60℃ 烘干备用;
- ◆ 有条件的实验室可为 RNA 实验准备单独的房间和单独的仪器;

RNA 提取具体操作

⊕ 每毫升 BIOZOL 对应样品的建议用量:

样 品	最大用量	最适用量
动/植物组织	100mg	50 mg
细菌	1.5 × 10 ⁹ 个	1 × 10 ⁷ - 5 × 10 ⁸ 个
酵母	1.5 × 10 ⁷ 个	5 × 10 ⁶ - 1 × 10 ⁷ 个
动物培养细胞	1.5 × 10 ⁷ 个	5 × 10 ⁶ - 1 × 10 ⁷ 个
丝状真菌	100mg	50 mg

⊕ 自备试剂

- * 液化氮 (样本为动/植物组织时需要)
- * 氯仿
- * 异丙醇
- * 75% 乙醇 (用 DEPC 处理过的水配制)
- * 无 RNA 酶的水【调配无 RNA 酶的水方法: 将去离子水加入无 RNA 酶的玻璃瓶中, 加入 DEPC 至 0.1% (v/v - DEPC/去离子水) 搅拌均匀放置过夜并高压灭菌】

(建议: 为RNA实验准备单独使用的试剂, 并做好标识, 以避免RNA酶的交叉污染)

1. 裂解

(1) 动/植物组织: 在液氮条件下将样品研磨成粉末, 匀浆时组织样品量按照建议用量;

(2) 单层贴壁生长的细胞: 吸尽培养液, 在直径 3.5 cm 的培养板中加入 1ml BIOZOL, 放置 5~10 分钟, 在放置过程中, 晃动 2~3 次, 保证细胞裂解完全, 将细胞裂解物移至离心管中。一般每 20~30 cm² 加 1 ml BIOZOL, 细胞量为 5×10^6 ~ 1×10^7 个;

(3) 悬浮生长的细胞: 通过离心来沉淀细胞。在 BIOZOL 试剂中用移液器反复吹打来裂解细胞。BIOZOL 按前言中建议的用量。在加入 BIOZOL 前应避免洗涤细胞而增加 mRNA 降解的可能性。破裂某些真菌和细菌可能需要使用匀浆器;

样本加入 BIOZOL 后, 如不立即进行后续提取步骤, 可保存于 -70℃ 冰箱 1 个月。

将匀浆样品在室温下孵育 15 分钟, 使样品充分裂解至匀浆液较透明, 如果仍有少量颗粒属于正常情况, 不影响 RNA 提取质量和得率。

可选步骤 I: 将匀浆液 4℃, 12,000g 离心 5 min, 取上清弃沉淀, 继续下面步骤;

2. 分离

按照 1: 5 (氯仿: BIOZOL) 的比例 (v/v) 加入氯仿。盖紧管盖, 振荡混匀并将其在冰上孵育 15 分钟, 于 4℃, 12,000×g 离心 15 分钟。离心后混合物分层: 上清层, 中间层, 下层; RNA 存在于上清层中。

可选步骤 II: 如需要进一步去除杂质, 以得到高纯度的 RNA, 可将水样层转移到一干净的离心管中。按照 5: 1: 1【BIOZOL: 氯仿: 饱和酚 (pH 4.5 ± 0.2)】的比例 (v/v/v) 加入氯仿和酚, 振荡混匀 15 秒。于 4℃, 12,000×g 离心 15 分钟, 离心后混合物仍然分层: 上清层, 中间层 (中间层可能并不明显), 有机层。

3. RNA 的沉淀

将上清层转移到一干净的离心管中, 加入等体积冰浴的异丙醇, 颠倒振荡混匀, 将混合的样品在 -20℃ 条件下孵育 20 分钟以上, 4℃, 12,000×g 离心 10 分钟。RNA 沉淀通常形成片状沉淀附着于管壁或管底。

4. RNA 的洗涤

弃去上清, 用冰浴的 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀一次, 按每 1ml 的 BIOZOL 至少加 1ml 的 75% 乙醇的比例加入 75% 乙醇。颠倒洗涤离心管管壁, 并旋涡振荡样品, 尽可能让沉淀悬浮, 4℃, 12,000×g 离心 5 分钟, 再次去除上清, 晾干沉淀。

5. RNA 的溶解

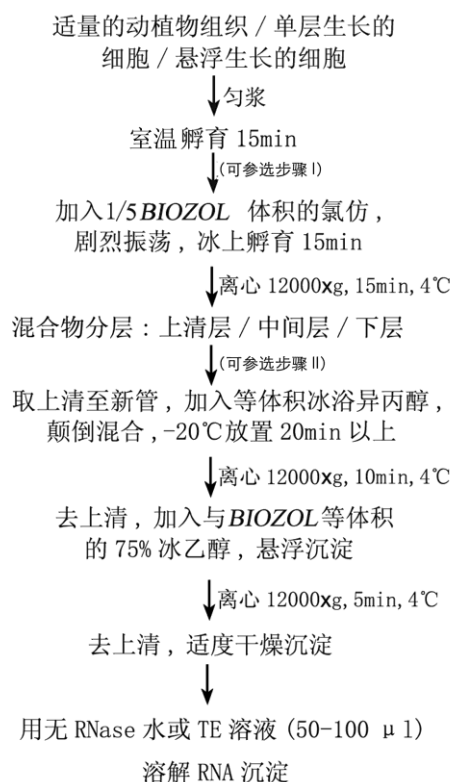
操作的最后, 在阴凉处适度干燥 RNA 沉淀 (避免过分干燥, 那样会降低它的可溶性)。用适量的无 RNA 酶水或 TE 溶液来溶解 RNA (一般可用 50~100μl 无 RNA 酶的水或 TE 溶液溶解 RNA)。抽提好的 RNA, 保存于 -70℃。

抽提注意事项:

① 抽提含蛋白质, 脂肪, 多糖的样品时, 例如肌肉, 脂肪组织和植物的块茎部分时可能需要额外的分离步骤。即匀浆后于 4℃, 12,000×g 离心 15 分钟, 如有脂肪漂在最上层因可以除掉, 然后将清亮的含有 RNA 的上层匀浆溶液转移到干净的试管中加入氯仿并继续进行后面的分离步骤。

② 如台式离心机最大转速不能达到要求的离心力, 则将离心时间适当延长。

RNA 提取操作步骤简图



附录 I : 常见问题及解决方案

问题	可能原因	我们建议的解决方法
抽提得率较低	样品均化或裂解可能不完全	适当延长裂解时间, 使样品充分裂解
	RNA 未完全溶解	RNA 延长溶解时间 在溶解前不要过度干燥
	不同种类的样本中, RNA 的含量差异较大, 一般情况下, 新生的、生长旺盛的组织或细胞中 RNA 含量丰富	选择较新鲜的, 生长旺盛的样品
	离心机转速和离心力不能达到操作要求	建议加大转速或延长离心时间
抽提的 RNA 有降解	动植物体组织取下后未立即进行抽提或冰冻保存	提取新鲜组织的 RNA, 并在研磨过程中不断加入液氮保持组织的生物活性
	溶液、试管及相关用具具有 RNase 污染	所有与 RNA 抽取相关的器具, 要做 RNase 去除处理
	抽提过程中没有戴手套或者没有勤换手套; 抽提过程中未注意避免说话, 造成唾沫中 RNA 酶污染	初学者操作过程中最好戴手套和口罩
	RNA 存放的温度有误	RNA 储存温度最好为 -70°C
抽提的 RNA 有 DNA 污染	样品匀浆后加入的 <i>BIOZOL</i> 量过少	在建议用量基础上减少组织量或加大 <i>BIOZOL</i> 使用量
	在上述 RNA 沉淀步骤将中间层吸入;	吸取上清时尽量小心操作

	加入氯仿前, 样本没有在室温下放置15分钟;	遵循操作指南, 保证样品充分裂解保证充分裂解在环境温度较低的情况下, 可适度延长放置时间
	加入氯仿后, 振荡过于剧烈;	轻柔振荡
	若匀浆后残留过多不溶固体颗粒也可产生 DNA 污染	可参考附加步骤 I
	出现污染与样品本身特性亦有关 (如: 富含蛋白质、脂肪等)	可参考附加步骤 I、II
OD260/OD280 比率偏低 (<1.65)	在分光光度计测量前用不适当的溶液稀释RNA样品, 低离子强度和低pH溶液会增加280 nm处的光吸收值;	采用 TE 或 Tris-HCl 溶解样品, 检测 OD 值
	匀浆后的样品所加的BIOZOL用量偏少;	在建议用量基础上减少组织量或加大 BIOZOL 使用量
	匀浆后的样品没有在室温下放置15分钟, 以充分裂解细胞;	适当延长裂解时间, 使样品充分裂解
	吸取含 RNA 上清层时, 不慎吸入了中间层;	吸上清小心操作
	RNA 没有完全溶解。	延长 RNA 溶解时间

附录 II: 关于 DNA 的污染

在大多数 PCR 扩增过程中其影响不是很大, 如果要进行严格的 mRNA 表达量分析, 我们建议在进行模板和引物的选择时:

- 选用跨内含子的引物, 以穿过 mRNA 中的连接区, 这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应;
- 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对;
- 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 Dnase I 处理。

附录 III: RNA 的得率与纯度

分光光度的定量分析

- 将分光光度计调零;
- 测的 OD_{260} , OD_{280} 进行接下来的浓度及纯度的计算;
终浓度 = $(OD_{260}) \times (\text{稀释倍数 } n) \times (D_{260} \text{ 转化因数})$

$$\text{Ratio} = OD_{260} / OD_{280}$$

⇒ RNA 的转化因数是 $0.040 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ 每 1 OD_{260}

⇒ Ratio: 1.8~2.0 显示 RNA 纯度很高

(在使用低 PH 值的 RNase-free 的纯水进行溶解剂稀释, 测出的结果较低)

附录IV：实验结果图片

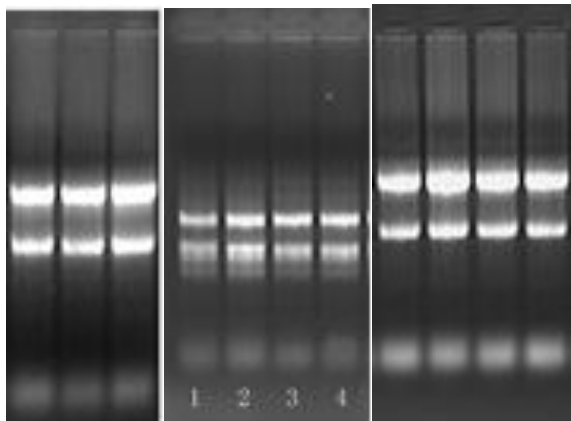


图 1

图 2

图 3

图 1 动物组织总 RNA；图 2 水稻叶片总 RNA；图 3 培养细胞总 RNA