BioFast BIOZOL Total RNA Extraction Reagent

BioFast BIOZOL 总 RNA 提取试剂

TECHNICAL SUPPORT:

For technical support, please dial phone number ： 0086-571-87774567-5215 or 5211, or fax to 0086-571-87774553

Email to reagent@bioer.com.cn.

Website: www.bioer.com.cn

试剂盒组成

货号	BSC59M1
试剂盒组成	**100 人份**
BIOZOLTotal RNA Extraction Reagent	100ml
说明书	1 份
RNA 研磨管	100 管

储存与运输

- ◆ 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

BioFast 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、植物等细胞或组织中的总 RNA 提取。样本在装有 Biozol 试剂的研磨管中充分裂解后加入氯仿离心,形成上清层、中间层和有机层,然后通过收集上清层,用异丙醇沉淀来得到 RNA。该方法步骤简单，不需要液氮研磨，使操作者熟练程度对结果的影响减少，可以在 40 秒内快速的同时处理 24 种不同的样品，大大缩短了操作时间，并保证了实验的稳定性。

BioFast 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。实验前请详细阅读使用手册,已达到最好的提取效果：

- ◆ 全程佩戴手套、口罩,以防止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:将金属制品洗净后,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/in^2(1.034×105Pa)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

⊕自备试剂

＊ 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

首先在研磨管中加入 1mlBiozol 试剂， 取适量的组织样本放入装有 1ml Biozol 试剂的研磨管中，6.0m/s 研磨 30-40 秒，匀浆时组织样品量按照建议用量;

样本加入BIOZOL中研磨处理后,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 5 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℃,12,000rpm 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,振荡混匀并将其在室温下孵育 2-3 分钟,于 4℃,12,000rpm 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（pH4.5±0.2）】的比例(v/v/v)加入氯仿和酚,振荡混匀15 秒。于4℃,12,000rpm 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,将混合的样品在室温下孵育 10 分钟,4℃,12,000rpm 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,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℃,12,000rpm 离心 5 分钟,再次去除上清,晾干沉淀 5-10min。

⊕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 50μl 无 RNA 酶的水或 TE 溶液溶解 RNA）。抽提好的 RNA,保存于 -70℃。

RNA 提取操作步骤简图

首先在研磨管中加入 1mlBiozol 试剂，
取 50mg 的新鲜或-80℃冻存的动植物组织
样本放入装有 1mlBiozol 试剂的研磨管中

↓

放入研磨机中 6.0m/s 研磨 40s

↓

室温孵育 5 分钟

↓

加入 200ul 氯仿

↓

剧烈震荡，室温孵育 2-3min

↓

离心 12000rpm*15min,4℃

↓

取上清到新的离心管中，加入等体积预冷的异丙醇

↓

室温孵育 10min

↓

离心 12000rpm*10min,4℃

↓

小心去除上清，加入 1ml 75%冰乙醇，使沉淀悬浮

↓

离心 12000rpm*5min,4℃

↓

去上清，干燥 5-10min，用 50ulTE 溶解。-70℃保存。

附录Ⅰ:常见问题解答

问题	可能原因	我们建议的解决方法
抽提得率较低	样品均质化或裂解可能不完全	适当延长研磨时间及强度,使样品充分裂解
	RNA 未完全溶解	延长 RNA 溶解时间
		在 RNA 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	提取新鲜的或-80℃冻存的组织 RNA,样本取样后立即放入装有 Biozol 的研磨管中研磨。
	溶液、试管及相关用具有 RNase 污染	所有与 RNA 抽取相关的器具,要进行 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℃
	研磨管反复使用	研磨管重复使用，如果处理不当，导致 RNA 酶污染。
抽提的 RNA 有 DNA 污染	样品匀浆后加入的BIOZOL量过少	在建议用量基础上减少组织量或加大 BIOZOL 使用量
	在上述抽提RNA的步骤中吸入中间层;	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5分钟;	遵循操作指南,以保证样品充分裂解。为保证充分裂解，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 25mM Tris-HCl（pH7.5）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5分钟,以充分裂解细胞;	在低温环境下适当延长裂解时间,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

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℃,12,000rpm离心5 分钟,如有脂肪漂在最上层可以除掉,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,则需要将离心时间适当延长。**

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

- ●取一定量的 RNA 提取物,用 25mM Tris-HCl（pH7.5）稀释 *n* 倍,已备分光光度测定;
- ●用 Tris-HCl 将分光光度计调零;
- ●取 100μl 稀释液进行测定,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})×(稀释倍数 *n*)×(D_{260}转化因数)

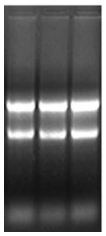
  Ratio= OD_{260}/ OD_{280}

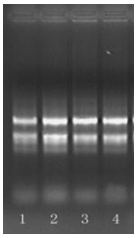
  - ⇨ RNA 的转化因数是 0.040μg/μl 每 $1OD_{260}$
  - ⇨ 注意： OD_{260}测得值范围：0.1 <OD_{260}< 1.0
  - ⇨ Ratio：1.8～2.1 显示 RNA 纯度很高

（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：实验结果图片见英文

对于常见样品，**BioFast-BIOZOL** 提取 **RNA** 可获得非常好的结果，如有客户需要提取特殊不常见的样品，请电话咨询我公司技术人员。





Picture 1：Total RNA extracted from animal tissues

Picture 2 Total RNA extracted from rice leaves