

ExCell Bio

RNA Lyzol (总 RNA 提取试剂)

User Manual

Catalog Number	MB000-0011	25 mL
	MB000-0012	100 mL



产品概述

RNA Lyzol 是即用型细胞和组织总 RNA 提取试剂，内含异硫氰酸胍等物质。在样品裂解或匀浆过程中，RNA Lyzol 能迅速破碎细胞，同时抑制细胞释放出的核酸酶，以保持 RNA 完整性。加入氯仿离心后，溶液会形成上清层、中间层和有机层，RNA 存在于上清层。收集上清层后，经异丙醇沉淀可以回收得到总 RNA。

RNA Lyzol 试剂可以从动物组织、植物材料、血液、培养细胞、各种微生物中提取总 RNA，可同时处理大量不同样品。实验操作快速方便，整个操作可在 40 分钟内完成。提取的总 RNA 可避免 DNA 和蛋白质污染，直接用于 Northern blot 分析、斑点杂交、体外翻译、RNA 酶保护分析、RT-PCR 和分子克隆等各种分子生物学实验。

用户自备试剂

DEPC、氯仿、异戊醇、异丙醇、无水乙醇、70%乙醇、糖原、液氮、RNase-free 的离心管与 Tips。

RNA 提取实验前的准备工作

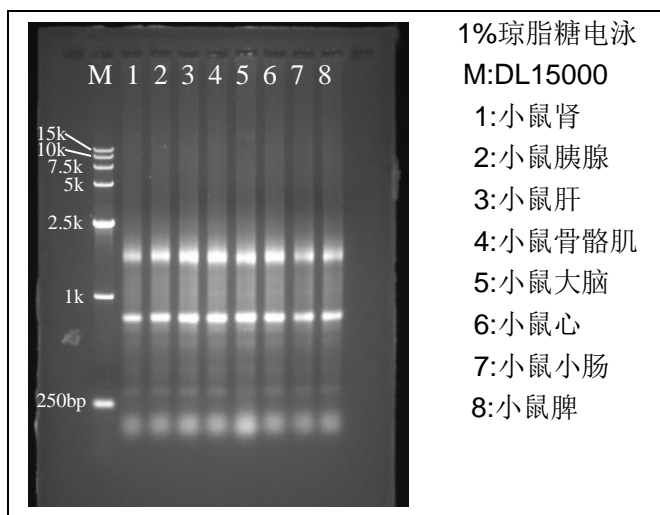
RNA 酶(RNase)是导致 RNA 降解最主要的物质，非常稳定。在一些极端的条件可暂时失活，但限制因素去除后又迅速复性。由于酶的活性难以抑制，所以必须防止其引入。进行 RNA 工作时，应遵守下列准则：

1. 操作时一直带着手套。如果使用一次性手套，需要经常更换。皮肤上通常包含的细菌和霉菌，可污染 RNA 的制备，同时也是 RNA 酶的一个来源。良好的微生物操作技术可防止微生物污染。
2. 塑料制品、玻璃和金属物品的处理。
 - 1) 塑料制品：使用一次性无 RNase 的塑料器皿和枪头以避免交叉污染。未标明 RNase-free 的塑料制品，原则上处理后方可使用。处理方法如下：
 - a) 在玻璃烧杯中注入去离子水，加入 DEPC 使其终浓度为 0.1% (v/v，后文中记作 DEPC-H₂O)。

注意：DEPC 为活性很强的剧毒物，须在通风柜中小心使用。

- b) 将待处理的塑料制品放入一个可以高温灭菌的容器中，注入 DEPC-H₂O，使塑料制品的所有部分都浸泡到溶液中，在通风柜中 37℃或室温下处理过夜。
 - c) 将容器中的 DEPC-H₂O 小心倒入废液瓶中，以铝箔封口，高温高压蒸汽灭菌至少 30 分钟。
 - d) 灭菌塑料制品在合适的温度(80-90℃)下烘烤干燥。置洁净处备用。
- 2) 玻璃和金属物品 250℃烘烤 3 小时以上。
3. 配制溶液需要用 RNase-free ddH₂O（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度为 0.1% (v/v)，放置过夜，高压灭菌）。

相关数据



样本类型	得率 (µg)
1g 水稻叶片	100-200
1mg 大鼠肝脏	6-10
10 ⁶ 培养细胞	5-10
1mL 大肠杆菌	2-10
1mL 人全血	3-5

产品组分及储存条件

组分	MB000-0011	MB000-0012
RNA Lyzol	25 mL	100 mL

可在常温下运输；2-8℃下避光保存，有效期一年。

实验流程

1. 1mL RNA Lyzol 处理的样本量

动物细胞	1×10 ⁷
动物组织	50 mg
植物组织	100 mg
细菌	1×10 ⁹
酵母	1×10 ⁷
丝状真菌	100 mg
血液	200 μL

2. 匀浆处理

- 1) 动物、植物组织：在液氮中将组织碾磨成粉末，趁液氮尚未挥发光时，将粉末转移到 1.5 mL 离心管中。加入 1 mL RNA Lyzol，剧烈振荡或用匀浆器匀浆。
- 2) 贴壁培养细胞：在 3.5cm 直径的培养皿中加入 1 mL RNA Lyzol，反复吹打几次促进细胞裂解。
注意：RNA Lyzol 试剂的添加量基于培养的面积而不是细胞的数目（每 10 cm² 加入 1 mL）。RNA Lyzol 试剂量不足可能会导致分离出的 RNA 有 DNA 的污染。
- 3) 悬浮培养细胞：细胞经计数后直接加入离心管，然后 5,000 rpm 室温离心去上清。每 1×10⁷ 动物和酵母细胞或每 1×10⁹ 细菌细胞加入 1 mL RNA Lyzol，用 1mL 移液器反复吹打以裂解细胞。
注意：使用 RNA Lyzol 前避免洗涤细胞，以免降解 mRNA。
- 4) 血液处理：取 200 μL 新鲜血液，加入 1 mL RNA Lyzol，充分振荡混匀。

补充：如果组织量（1-10 mg）或细胞数很少（10²-10⁴），在样品中加入 800 μL 的 RNA Lyzol，用枪头反复吹打混匀，再加入糖原(终浓度为 250μg/mL)，剧烈振荡或用匀浆器匀浆。

3. 加入 200μL 氯仿/异戊醇(24 : 1)或氯仿，剧烈振荡混匀 30 秒。
4. 台式离心机上，12,000 rpm，4°C离心 5 分钟。
5. 将上清液小心转移到 RNase-free 1.5 mL 离心管里，加入等体积的异丙醇，4°C下放置 5 分钟。
注意：不要吸取任何中间层物质，否则会出现染色体 DNA 污染。
6. 台式离心机上，12,000 rpm，4°C离心 5 分钟。
7. 小心移去上清液，防止 RNA 沉淀丢失。
8. 用 70% 乙醇洗涤两次，每次 700μL，12,000 rpm，4°C离心 2 分钟。

9. 尽可能彻底地吸走上清，防止 RNA 沉淀丢失。
10. 真空离心干燥 3-5 分钟或 8000 rpm 瞬时离心后用 10 μ L 枪头去废液，再放在室温下使乙醇完全挥发。
11. 沉淀用 30-50 μ L DEPC-H₂O 溶解。如发现沉淀难溶，68 $^{\circ}$ C处理 10 分钟。对于胰腺、肾等组织中 RNase 含量很高，沉淀用 100%去离子甲酰胺溶解。
12. DNA 的分析和定量：
 - 1) 测定样品在 260nm 和 280 nm 的吸收值确定 RNA 的质量。按 1 OD₂₆₀ = 40 μ g/mL RNA 计算 RNA 的产率，OD_{260/280} 在 1.8-2.0 视为抽提的 RNA 的纯度很高。若需精确量化，只有浓度在 4 μ g/mL 以上的样品适于用分光光度计测定。
 - 2) 进行甲醛变性琼脂糖电泳，确定 RNA 的完整性和污染情况。

备注

RNA Lyzol内含强腐蚀性物质，如果接触皮肤、吞咽等会导致中毒或灼伤。使用本产品时应做好防护工作，如穿好防护服装，佩戴手套、眼罩和面罩等。如果不小心与皮肤和眼睛接触，应立即用大量水冲洗，严重时请前往医院治疗。

在确认本产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

常见问题及解答

- 1、OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值<1.65，为什么？
 - 1) 进行分光光度分析之前，RNA 样品溶于水中而不是 TE 中。低离子强度和低 pH 值溶液可使 280 nm 的吸光度升高。
 - 2) 样品匀浆时加的试剂量太小，造成蛋白变性不充分，可以再次对 RNA 溶液进行苯酚/氯仿抽提。
 - 3) 相分离后，吸取上清层时不小心吸到蛋白造成污染。
 - 4) 最后得到的 RNA 沉淀未完全溶解
- 2、RNA 提取量较低，应如何改进？
 - 1) 加入 RNA Lyzol 后，请进行充分的研磨或匀浆，使样品充分裂解。
 - 2) 相分离后，尽可能多的收集上清液。

3) 最后得到的 RNA 沉淀需要完全溶解。

3、提取的 RNA 降解，为什么？如何改进？

1) 样品中的 RNA 发生降解

- 尽量选择新鲜的样品，样品采集后应迅速用液氮处理。
- 材料保存在液氮中或-80℃条件下，材料均不宜长期保存，且避免反复冻融。
- 幼嫩新鲜的材料 RNA 含量高且完整，衰老或病害等受损的材料中 RNA 降解比较严重。

2) 操作环境的 RNase 污染

- RNA 提取尽量选择洁净的环境，由于自然条件下空气中含有较多的 RNase，建议对提取环境进行 RNase 的清除处理。

3) 提取用具带来的 RNase 污染

- 提取用所有的玻璃器皿可通过高温灭活（25℃烘烤 3 小时以上）去除 RNase。
- RNA 样品所接触的所有塑料制品（如枪头、电泳槽等都需要通过 DEPC 或 NaOH 处理严格去除 RNase 后才可使用）

4) RNA 溶解用水带来的 RNase 污染

- 配制 DEPC-H₂O 时需剧烈振荡使 DEPC 与水充分接触反应（DEPC 与水反应后会产生大量的气体，可用塑料膜将瓶口扎紧，剧烈混匀后通过观察塑料膜是否胀气来判断反应是否充分）。
- DEPC 处理后应避光静置过夜，高压灭菌。

5) 操作中带入的 RNase 污染

- 人的皮肤、汗液和呼出的气体中含有大量的 RNase。操作人员可通过经常更换一次性手套，佩戴口罩等措施减少此类污染。

6) RNA Lyzol 的添加量不够

- 提取的组织材料中含有大量的 RNA 分解酶时，应加大 RNA Lyzol 的用量

4、提取的 RNA 中有 DNA 污染，为什么？

1) 匀浆时使用的 RNA Lyzol 的体积太小。

2) 样品中含有有机溶剂（如乙醇、DMSO 等），强缓冲液或碱性溶液。