

RNASw ZOL 总RNA 提取试剂使用说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
YT100-100	RNASw ZOL Reagent	100ml/500ml
	使用说明书	1 份

【保存条件】

4°C 避光保存一年

【概述】

RNASw ZOL Reagent 是即用型细胞和组织总RNA 提取试剂，该试剂是一步法苯酚和异硫氰酸胍解决方案。该试剂可保持样品RNA 的完整性，同时破坏细胞及溶解细胞成分。加入氯仿离心后，裂解液分相成水相和有机相。RNA 存于水相，通过异丙醇沉淀回收。

此方法可完美应用于少量人类、动物、植物或细菌来源的组织 and 细胞，允许大量样本同时处理。整个过程可在一小时内完成，同时可避免蛋白质和DNA 污染。

【操作方法】

1. 样品处理：

a. 组织：将组织在液氮中研磨，磨碎后及时于每 50-100mg 组织中加入 1ml RNASw ZOL Reagent，样品体积不应超过RNASw ZOL Reagent 体积的 10%（或使用匀浆仪器）。

b. 单层细胞：直接在培养皿中裂解细胞，如 35mm 直径的培养皿中加入 1ml RNASw ZOL Reagent，使用吸头吹匀促进细胞裂解。RNASw ZOL Reagent 的试剂量基于培养的表面积而不是细胞数量（每 1cm² 加入 1ml RNASw ZOL Reagent），RNASw ZOL Reagent 试剂量不足可能会导致分离出的 RNA 有DNA 污染。

c. 悬浮细胞：先低速离心沉淀细胞，弃培养液后加入RNASw ZOL Reagent（1ml RNASw ZOL Reagent 加入至 5×10⁶ 动物、植物、酵母或细菌细胞中）。加入RNASw ZOL Reagent 前避免洗涤细胞，这容易导致 mRNA 降解。一些酵母和细菌细胞的裂解可能需要使用均质器。

可选：一些样品可能需要额外的分相步骤，这些样品蛋白质、脂肪、多糖或细胞外 基质含量高，如肌肉、脂肪组织、以及部分植物块茎。在根据上述方式处理后，于 2-8°C，12000g 离心 10 分钟，移除沉淀不溶物，RNA 存于上清中。

2. 相分离

- a. 将加完 RNASw ZOL Reagent 后的样品在室温（15-30℃）静置 5 分钟，以利于样品核蛋白体完全分离
- b. 按每 1ml RNASw ZOL Reagent 加入 0.2ml 氯仿（自备），小心盖好样品管后，剧烈震荡 15 秒，后置于室温（15-30℃）静置 2-3 分钟。
- c. 2-8℃，10000g 离心 15 分钟。离心后，混合物分离为下层（酚-氯仿相）、中间相以及上层无色水相。RNA 存在于上层无色水相中，体积约为最初加入 RNASw ZOL Reagent 体积的 60% 左右。

RNA 分离提取步骤：

1. RNA 沉淀

- a. 将上述水相转移到一个新的管中，并保存有机相（若希望分离 DNA 或蛋白质）。混合异丙醇从水相中沉淀 RNA，每 1ml 用于初始裂解的 RNASw ZOL Reagent 使用 0.5ml 异丙醇，室温（15-30℃）静置 10 分钟。
- b. 2-8℃，10000g 离心 10 分钟。离心前看不出 RNA 沉淀，离心后在管侧和管底会出现胶状沉淀即为 RNA 沉淀。

2. RNA 洗涤

- a. 弃上清。用 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀一次，每毫升用于初始裂解的 RNASw ZOL Reagent 试剂使用至少 1ml 75%乙醇，涡旋混匀后于 2-8℃，不超过 7500g 离心 5 分钟，弃上清

3. 溶解 RNA

- a. 在上述过程结束后，简单干燥 RNA 沉淀（空气干燥或真空干燥 5-10 分钟，不要真空离心离心干燥 RNA）。重要的是不要让 RNA 沉淀过于干燥，这将大大降低其溶解度。加入 25-200 μ l 无 RNase 水或 0.5%SDS，用吸头吹打几次至溶解，于 50-60℃ 放置 10 分钟使 RNA 彻底溶解（注：若后续进行酶学实验，请勿使用 0.5%SDS 溶液溶解）。溶解后置于 -80℃ 保存。

DNA 分离提取步骤：

1. DNA 沉淀

- a. 样品加入氯仿分层后，移去上层水相提取 RNA，吸取中间层和有机层的 DNA 用乙醇沉淀。每使用 1ml RNASw ZOL Reagent 加入 0.3ml 无水乙醇混匀，室温静置 2-3 分钟，2-8℃ 不超过 2000g 离心 5 分钟以沉淀 DNA。

2. DNA 洗涤

- a. 移去苯酚-乙醇上清液（如需要，保存上清用于蛋白质分离，操作见下）。用 0.1M 的柠檬酸钠溶液（溶于 10%乙醇的柠檬酸钠溶液）清洗沉淀的 DNA。每毫升用于初始的 RNASw ZOL Reagent 试剂添加 1ml 溶液。每次清洗时，室温静置 30 分钟 DNA 沉淀（间歇混匀），2-8℃ 2000g 离心 5 分钟，弃上清。重复一次。

b. 用 75%乙醇再洗一遍 DNA 沉淀，每使用 1ml RNASw ZOL Reagent 加入 1.5-2ml 75% 乙醇，室温放置 10-20 分钟（间歇混匀），2-8° C 2000g 离心 5 分钟，弃上清。

c. 室温放置晾干 DNA 5-15 分钟，用 8mM NaOH 溶解 DNA。从 50-70mg 组织或 10^7 细胞中分离的 DNA 溶于 300-600 μ l 8mM 的 NaOH 溶液中，浓度常为 0.2-0.3 μ g/ μ l。

注：提取的 DNA 沉淀不易溶于水和 Tris 缓冲液中，建议用弱碱溶解，8mM NaOH 的 pH 值为 9，NaOH 溶液溶解后可用 TE、HEPES 调节 PH。从某些样品（尤其是组织）中提取的 DNA 中可能包含一些胶状不溶物可用 >12000g 离心 10 分钟除去。

蛋白质分离操作步骤：

1. 蛋白质沉淀

a. 苯酚-乙醇上清液（每 1ml RNASw ZOL Reagent 试剂上清体积约 0.8ml）中加入异丙醇可沉淀出蛋白质。每毫升用于初始裂解 RNASw ZOL Reagent 试剂中添加 1.5ml 异丙醇，室温静置 10 分钟，然后 2-8°C 12000g 离心 10 分钟以沉淀蛋白质，弃上清。

2. 蛋白质洗涤

a. 用 0.3M 盐酸胍溶液（溶于 95%乙醇）洗涤蛋白质沉淀 3 次。每毫升用于初始裂解的 RNASw ZOL Reagent 试剂中添加 2ml 0.3M 盐酸胍溶液。每次洗涤中，室温静置 20 分钟，2-8°C 7500g 离心 5 分钟，弃上清，重复 3 次。最后清洗后，加入 2ml 无水乙醇，漩涡混匀蛋白沉淀，室温静置 20 分钟，然后 2-8°C 7500g 离心 5 分钟以沉淀蛋白质，弃上清。

3. 蛋白质溶解

a. 真空干燥蛋白质沉淀 5-10 分钟，用 1% SDS 溶解蛋白质，反复吹打，50°C 温浴至完全溶解，不溶物 2-8°C 10000g 离心 10 分钟去除。分离得到的蛋白质样品可用于 WesternBlot 或者 -20°C 保存（长期保存建议 -80°C）

【注意事项】

1. RNA 酶污染注意事项:

- a. 提取过程用品均经过去 RNA 酶处理: 玻璃制品可以 150℃ 烘烤 4 小时, 塑料制品可浸泡于 0.5M NaOH 溶液后用清水冲洗并高压灭菌, 吸头及离心管类尽量使用一次性 无酶吸头及离心管
- b. 佩戴手套及口罩及护目镜: 皮肤上常含有细菌和霉菌, 可污染 RNA 制备, 且同时是 RNA 酶来源, 同时 RNASw ZOL Reagent 对皮肤有一定毒性, 建议佩戴手套及口罩 及护目镜。
- c. 尽量于通风橱内提取: 避免吸入提取过程中有毒物质。

2. 安全性问题:

- a. 本品在与皮肤接触及吞咽有毒性, 可导致烧伤。与皮肤接触后, 应立即用洗涤剂和大量水冲洗。
如感到身体不适, 应立即就医

3. 存储性问题:

- a. 实验已证明 RNASw ZOL Reagent 室温下可稳定保存 12 个月, 不过依然建议储存于 2-8℃ 以保证最佳性能, 尽量避光保存。