

## RNAEx 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
EK-5301	RNAEx 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】

RNAEx 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，裂解液分享成水相和有机相。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 RNAEx ZOL Reagent, 样品体积不应超过 RNAEx 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 RNAEx ZOL Reagent, 使用吸头吹匀促进细胞裂解。RNAEx ZOL Reagent 的试剂量基于培养的面积而不是细胞数量 (每 1cm<sup>2</sup> 加入 1ml RNAEx ZOL Reagent), RNAEx 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 RNAEx ZOL Reagent (1ml RNAEx ZOL Reagent 加入至 5×10<sup>6</sup> 动物、植物、酵母或细菌细胞中)。加入 RNAEx 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享步骤, 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 RNAEx ZOL Reagent 后的样品在室温（15-30°C）静置 5 分钟，以利于样品核蛋白体完全分离
- b. 按每 1ml RNAEx 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°C）静置 2-3 分钟。
- c. 2-8°C，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 RNAEx 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 RNAEx ZOL Reagent 使用 0.5ml 异丙醇，室温（15-30°C）静置 10 分钟。
- b. 2-8°C，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 RNAEx ZOL Reagent 试剂使用至少 1ml 75%乙醇，涡旋混匀后于 2-8°C，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 25-200µl 无 RNase 水或 0.5% SDS，用吸头吹打几次至溶解，于 50-60°C 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°C 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 RNAEx ZOL Reagent 加入 0.3ml 无水乙醇混匀，室温静置 2-3 分钟，

2-8°C 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 RNAEx 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°C 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 RNAEx 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 $\mu$ l 8mM 的 NaOH 溶液中，浓度常为 0.2-0.3 $\mu$ g/ $\mu$ 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 RNAEx 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 RNAEx 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 RNAEx 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. 干空干燥蛋白质沉淀 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 °C 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 RNAEx 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 RNAEx ZOL Reagent 室温下可稳定保存 12 个月，不过依然建议储存于 2-8°C 以保证最佳性能，尽量避光保存。