

R6830 RNA-Solv[®] Reagent

简易中文步骤

警告：请勿吞食或皮肤接触该试剂，该试剂有毒性，还有可能会导致烧伤；若不小心皮肤接触该试剂，应立即用大量温和的洗涤剂和水清洗；如果感到不适，应立即就医。

产品：

| 货号 | 规格 |
|----------|-------|
| R6830-00 | 5mL |
| R6830-01 | 100mL |
| R6830-02 | 200mL |

储存条件：该试剂在 2°C-8°C条件下至少可以保存 24 个月。

简介：

RNA-Solv[®] Reagent 是一种用于从细胞和组织中分离总 RNA 的试剂系统。该试剂是由苯酚和异硫氰酸胍组成的单一溶液，是由 Chomczynski 和 Sacchi 开发的单步 RNA 分离方法的改进 (1)。样品在 RNASolv[®] Reagent 中匀浆和裂解，在破坏和变性内源性 RNA 酶和其他细胞成分的同时，保持了 RNA 的完整性。用氯仿提取裂解物进一步使蛋白质变性并将混合物分离成有机相和水相。RNA 仅保留在水相中，随后通过异丙醇回收。

该方法适用于从人、动物、植物或源于细菌得到的少量组织样品 (< 100mg) 和细胞 (< 5×10⁶)，大量组织 (最多 1g) 和细胞 (< 10⁸)。RNA-Solv[®] Reagent 方法操作简单，允许操作者一次同时处理多个样品，实验在 1 小时内可以完成。用该方法制备的总 RNA 可用于 Northern 印迹分析、斑点印迹杂交、poly(A)+选择、体外翻译 RNase 保护测定和分子克隆等实验。

实验准备：

- 氯仿 (不添加异戊醇)
- 异丙醇
- 80%乙醇 (用 DEPC 水处理)
- 无 RNase 的水
- 台式离心机，室温下可达 12,000xg

关于 RNase 污染的注意事项：

在提取 RNA 时：

- 时常佩戴一次性手套并经常更换手套。

- 使用无菌的一次性塑料器皿和自动移液枪，保留用于 RNA 提取以防止 RNase 的交叉污染。
- 在 RNA-Solv[®] Reagent 存在的情况下，RNA 被保护免受 RNase 污染。下游样品处理要求使用不含 RNase 的玻璃器皿或塑料器皿。
- 仅使用 DECP-treated buffer。加入 DEPC 至终浓度为 0.1%，在 37°C 下孵育 2h，并在 121°C 下高压灭菌。但不要将 DEPC 添加到 Tris buffer，请使用 DECP-water 制备这种缓冲剂。

预防:

使用一次性聚丙烯管用于小样品，使用玻璃 Corex 管用于大样品。所用的离心管都必须能够承受 12,000xg 的离心速度，聚苯乙烯管可能会在使用氯仿时发生破裂。

实验前:

A. 小样品: 从非常小的样品 (< 10⁶ 个细胞或 < 10mg 组织) 中分离 RNA，在 0.8mL RNA-Solv[®] Reagent 中将样品进行匀浆 (或裂解)，并加入 1mg 无 RNase 的糖原或酵母 tRNA 作为载体。该操作可以提高通过沉淀获得的产率。

B. 困难动物样品: 若是含大量的蛋白质、脂肪、多糖或细胞外物质 (如肌肉、脂肪组织和精子) 的标本需要按照以下方案进行优化改进: 在 RNA-Solv[®] Reagent 中裂解/匀浆后，在室温下以 12,000xg 离心 10min 除去不溶性物质，该物质通常在离心管的底部，但对于脂肪组织，脂质层会在水相层的上方。在上清液 (水相) 中含有 RNA，必须小心转移到新的 1.5mL 微量离心管中，再进行实验。

C. 中断实验: 在 RNA-Solv[®] Reagent 中裂解后，但在加入氯仿之前，样品可以在 -70°C 下储存长达 3 个月。此外，若 RNA 已使用异丙醇沉淀，该产物沉淀可以在 -20°C 或 -70°C 下储存长达 1 年。

RNA-Solv[®] Reagent 提取总 RNA 的方案:

注意: 在使用 RNA-Solv[®] Reagent 时，请佩戴手套和护目镜，避免试剂接触到皮肤和衣服。可在化学通风橱中进行实验，以避免吸入蒸气。以下步骤除非另有说明，否则均在室温下 (20°C-25°C) 进行。

1. 样品匀浆和裂解: 按照以下操作其中一条即可

a) 组织样品

使用适当的机械匀浆器，每 50-100mg 组织加入 1mL RNA-Solv[®] Reagent 进行匀浆裂解，或者也可以用研钵和研杵，在液氮中将组织样品粉碎，后将粉碎的样品转移到

1.5mL 离心管中。如果没有陶瓷研钵和研杵,可使用一次性微管杵(Eppendorf, Cat No. 0030 120.973; VWR, Cat No. KT 749520-0000)使微量离心管中的样品匀浆化。样品体积不应超过所用 RNA-Solv[®] Reagent 体积的 10%。

b) 在悬浮液中生长的细胞

通过离心沉淀细胞。通过重复移液在 RNA-Solv[®] Reagent 中裂解细胞。每 $5-10 \times 10^6$ 个动物、植物或酵母细胞或 1×10^8 个细菌细胞加入 1mL RNA-Solv[®] Reagent。在加入 RNA-Solv[®] Reagent 之前应避免洗涤细胞,因为这会增加 mRNA 降解和 RNase 污染的可能性。对于植物、真菌和酵母细胞,建议使用来自 Omega Bio-tek 的 E.Z.N.A.[®] Plant (R6827), Fungal (R6840), 和 Yeast (R6870) RNA 试剂盒。

c) 单层生长的细胞

将 1mL 的 RNA-Solv[®] Reagent 加入到直径 3.5cm 的培养皿中裂解细胞,用蓝色的移液枪头将细胞裂解液吹打数次,加入的 RNA-Solv[®] Reagent 的量在培养皿中,约 $1\text{mL}/10\text{cm}^2$,若加入的 RNA-Solv[®] Reagent 不足可能会导致 DNA 污染,如果裂解液太粘稠而无法用移液枪吸出,则需增加 RNA-Solv[®] Reagent 的用量。

2. 每 1mL RNA-Solv[®] Reagent 中加入 0.2mL 氯仿,将样品管盖好盖子后涡旋混匀 15s,在冰上孵育 10min。此步骤至关重要,不要随意更改此步操作。

3. 在 4°C 下,不超过 12,000xg 离心 15min,离心后溶液分为三层,分别为底部酚氯仿相,中间相和上部水相,其中 RNA 完全保留在上部水相中。

4. 沉淀 RNA。转移步骤 3 中上层水相的 80%至新的离心管中,弃去剩下的溶液。按照开始加入用于匀浆的每 1mL RNA-Solv[®] Reagent 加入 500 μ l 异丙醇,从水相中沉淀 RNA,在室温下孵育样品 10min,室温下不超过 12,000xg 离心 10min;

对于富含碳水化合物的样品:高多糖含量的植物样品或富含糖胺聚糖(蛋白多糖)的动物组织需使用以下改良的沉淀方法获得纯 RNA。制备缓冲液 A (1.2M 氯化钠, 800mM 柠檬酸钠),在步骤 3 后,向步骤 1 中使用的每 1mL RNA-Solv[®] Reagent 中加入 0.3mL 异丙醇,然后加入 0.3mL 缓冲液 A,涡旋混匀后在室温下不超过 12,000xg 离心 10min。这种高盐沉淀将减少复合碳水化合物的共同纯化。

5. 洗涤 RNA 沉淀。弃去上清液,加入 1mL 80%乙醇洗涤 RNA 沉淀,涡旋混匀,室温下不超过 7,500xg 离心 5min;

6. 重构 RNA。小心吸弃乙醇,在室温下短暂空气干燥 RNA 沉淀 2-5min,不要使用配备真空源的离心设备,因为过度干燥会导致 RNA 难以重新溶解在水中。将 RNA 溶解在不含 RNase 的水中——可能需要在 60°C 的水中孵育 5min。RNA 也可以在 100%甲酰胺(去离子)中重构并在 -70°C 中保存。

所得的 RNA 可用于 RNase 保护, Northern 分析和逆转录酶反应。为了分离 poly (A) + RNA, 需要额外的乙醇沉淀。加入 1/8 倍体积的不含 RNase 的 3M NaAc,

pH 6.0, 然后加入 2.5 倍体积的无水乙醇, 涡旋混合并在室温下孵育 5min, 在室温下以 12,000×g 离心 10min 并弃去上清液。按照上述方法洗涤沉淀并在 DECP 处理的水中重建 RNA。

产量和质量的测定:

通过对纯化得到的 RNA 进行 UV 分光光度分析以获得产率。因此, 在适当体积的 TE Buffer (pH8.0) 中稀释 RNA (不是水; 如果溶解在酸性缓冲液中, RNA 会产生较低的 Abs 比值) 并测得 260nm 和 280nm 处的吸光度。

$$\text{RNA 浓度} = 40\mu\text{g/mL} \times \text{稀释倍数} \times \text{A260nm}$$

用该方法获得的典型的 A260/A280 比值在 1.7-1.9, 产率根据样品的类型和数量以及在实验前的储存条件而变化。为了评估 RNA 的质量, 建议进行变性琼脂糖凝胶电泳, 以此来确认纯化的完整性。不变的是, 可以用 RNA-Solv[®] Reagent 来纯化全谱的 RNA, 包括 4S 和 5S 类型的 RNA。

每 1mg 组织或 10⁶ 个细胞的预期产量:

肝脾, 5-10μg

肾脏, 2-5μg

大脑, 1-2μg

内皮细胞, 7-12μg

成纤维细胞, 6-8μg

问题排查:

RNA 产量低: 加入的 RNA-Solv[®] Reagent 没有将样品完全裂解; RNA 沉淀未完全溶解在 DEPC Water 中; 用于分光光度计的稀释剂的 pH 太低。

RNA 降解: 组织样品未及时冻存或在取出后未能马上进行实验; 使用未被适当条件保存的原料进行 RNA 提取; 原样品中 RNA 丰度偏低; 用 (在 -5°C~-20°C, 而不是 -60°C~-70°C) 的胰蛋白酶/DEPC 来裂解单层细胞; 缓冲液或容器中含有 RNase。用于变性琼脂糖凝胶电泳的甲醛的 pH 低于 3。

A260/A280 过低: 样品在水中稀释而不是在 TE 中; 酸性 pH 降低吸光度比值; 使用 TE Buffer 作为稀释剂进行调零; 加入的 RNA-Solv[®] Reagent 没有将样品完全裂解; 未进行步骤 2 中的冰孵育; 水相被酚相污染。

有 DNA 污染: 用于处理样品的 RNA-Solv[®] Reagent 的量过少导致 DNA/核蛋白复合物与水相 RNA 分类不充分; 水相被酚污染。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准