

2. 电泳分析

取 0.5 µg RNA 上样于 1.0%琼脂糖凝胶，5V/cm 电泳 15-30 分钟。常规琼脂糖凝胶电泳时，RNA 上样量最好不要超过 0.5 µg。

3. DNA 污染的去除

RNAzol-easy RT Reagent 可去除 99%的基因组 DNA 污染。大多数的应用，如 Northern 杂交，Poly (A)富集等无需进行处理。由于 PCR 敏感高，对单拷贝数的基因也都有可能被扩增，若纯化的 RNA 用于 RT-PCR，建议使用 DNase I 消化，才能彻底去除 DNA 的污染。

常见问题

1. 提取的 RNA 产量低或降解了

- RNA过于干燥，或RNA还没有完成溶解；
- 样品匀浆不够充分，或匀浆时间过长，导致溶液升温而引起RNA的降解；
- 操作过程中引起RNASE污染。

2. DNA 的污染

- **RNAzol-easy RT Reagent**的用量与组织用量关系不对；
- 样品中含有有机溶剂或其他保存液；
- 匀浆不彻底，裂解液太粘稠；
- 加入ddH₂O时没有剧烈振荡，或采用涡旋代替振荡。

3. 纯度低 (OD260/OD280<1.65)

- **RNAzol-easy RT Reagent**的用量与组织用量关系不对；
- 加入ddH₂O时没有剧烈振荡，或采用涡旋代替振荡；
- ddH₂O过量加入或有酚的残留；
- 裂解不够充分，匀浆后须室温放置5分钟。



RNAzol-easy RT Reagent

一步法 RNA 抽提试剂

| 产品货号 | 包装规格 |
|---------|--------|
| FP314-1 | 100 mL |
| FP314-2 | 200 mL |

For Research Use Only

ABP Biosciences Inc

安迪福诺生物科技（武汉）有限公司

地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道666号
光谷生物城生物创新园C2-4栋五楼

电话：400-066-7718 邮箱：info@abpbio.com

网址：www.abpbio.com www.abpbio.com.cn



产品简介

RNAzol-easy RT Reagent 是一款从细胞, 组织及细菌中提取 RNA 的即用型试剂。**RNAzol-easy RT Reagent** 可快速裂解细胞, 让 RNA 释放至溶液中, 并可快速灭活核酸酶, 保护 RNA 不降解。裂解液无需加氯仿分层, 样品裂解后加水可以诱导 DNA, 蛋白质, 多糖和其他分子从裂解液中沉淀出来并离心除去。RNA 通过分离上清液, 乙醇沉淀, 洗涤获得高纯样本。**RNAzol-easy RT Reagent** 适合于从各种生物样品中快速提取高纯度的总 RNA。纯化的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern 杂交、Poly(A)富集等下游应用。

保存条件

RNAzol-easy RT Reagent 可在室温保存 12 个月。长期保存时建议在 2~8°C 下避光保存。

实验所需耗材 (不包含在试剂中)

- 异丙醇
- 75%乙醇(DEPC 处理水配制)
- DEPC 处理水或RNase Free Water
- 准备Lysozyme裂解液: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA 加Lysozyme至终浓度20 mg/mL, 于2-8 °C保存。
- RNase-Free 的1.5 mL 离心管和枪头
- 匀浆工具
- 高速离心机(12,000 x g)

RNAzol-easy RT Reagent 的用量与组织的关系

| 样品类型 | 样品用量 | RNAzol RT 用量 |
|------|--|--------------------------------|
| 组织样品 | <10 mg 10-100 mg | 0.8 mL+100 µg Glycogen 1 mL |
| 贴壁细胞 | 培养面积 10 cm ² | 1 mL |
| 悬浮细胞 | 10 ² -10 ⁵ 细胞 5-10 x 10 ⁶ 细胞 | 0.8 mL+100 µg Glycogen 1 mL |
| 全血 | 100 µL | 1 mL |

注: 样品的体积不能超过 **RNAzol-easy RT Reagent** 体积的 10%。Glycogen 需另外购买, 使用时, 请用 DEPC 配制成 20 mg/mL。样品在 **RNAzol-easy RT Reagent** 中充分匀浆后, 可在 4°C 保存 3 天, -20~80°C 保存六个月以上。

操作流程

- 按下列方法对样品进行匀浆。
 - ❖ 动物组织: 称取10-100 mg 动物组织到离心管中, 加入1 mL **RNAzol-easy RT Reagent**, 立即用研磨杵或匀浆器进行充分匀浆。动物组织样品也可以用液氮研磨(参照植物处理方法)。
 - ❖ 植物组织: 用液氮将植物样品磨成粉末状, 称取30-100mg 样品至离心管中, 立即加入1 mL **RNAzol-easy RT Reagent**, 涡旋充分打散样品。

- ❖ 贴壁细胞: 彻底去除培养液, 对10 cm² 培养面积, 加入1 mL **RNAzol-easy RT Reagent**, 移液枪吸打3-5 次, 让细胞充分裂解。
 - ❖ 悬浮细胞: 500 x g 离心收集细胞(<1 x 10⁷ 细胞), 去除培养液。涡旋或用手指弹打松散细胞团。加入1 mL **RNAzol-easy RT Reagent**, 移液枪吸打3-5次让细胞充分裂解。
 - ❖ 细菌: 离心收集(1 x 10⁸细菌), 加入100 µL Lysozyme裂解液处理10 分钟, 然后加入1 mL **RNAzol-easy RT Reagent**, 涡旋1分钟。
 - ❖ 微量真菌: 转移<50mg 真菌样品至2 mL真菌/细菌匀浆管中, 加入1 mL **RNAzol-easy RT Reagent**, 高速涡旋5-10分钟裂解真菌。
- 室温放置3~5 分钟。
 - (可选) 4°C, 12,000 x g 离心 10 分钟。转移上清液至新的离心管中。

Note: 处理富含蛋白质或难裂解的组织样本时, 匀浆后仍可能存不溶解的物质。离心去除这些杂质有利于提高纯度。富含脂肪的样本, 离心后还会在溶液表面存在一层油脂层, 转移上清液时尽量不要吸取到油脂。

- 按 1 mL **RNAzol-easy RT Reagent** 加入 400 µL ddH₂O 至裂解液中。用手剧烈振荡 15 秒, 室温放置 5-15 分钟。

Note: 用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。振荡必须快速的, 缓慢颠倒会造成抽提不充分。
- 室温 12,000 x g 离心 15 分钟。

Note: 离心后 DNA 和蛋白质及多糖形成沉淀在离心管底部, 而 RNA 保留在上清液中。
- 小心转移上清液至新的 2 mL 离心管中。加入等倍体积异丙醇, 颠倒或涡旋混匀, 室温静置 10 分钟。
- 室温 12,000 x g 离心 10 分钟沉淀 RNA。
- 倒弃上清液。加入 1 mL 75%乙醇, 涡旋或颠倒混匀。
- 室温 8,000 x g 离心 3 分钟。
- 倒弃上清液, 把离心管反扣于干净的吸水纸上吸弃残留的液体。空气干燥 10-15 分钟。

Note: 倒弃上清液后, 若管壁上仍残留较多的液体, 短暂离心收集管壁上的液滴, 用 10-100 µL 的枪头吸弃残液, 再空气干燥 5-10 分钟。空气干燥时间过长会导致 RNA 很难溶解。

- 加入适量的缓冲液、100%甲酰胺、DEPC 处理水、或无核酸酶的水至 RNA 沉淀中。涡旋重悬 RNA 沉淀。冰上放置 10-30 分钟让 RNA 充分溶解。

Note: 若需要长时间保存RNA, 请用100%甲酰胺溶解RNA。若RNA 比较难于溶解, 可50°C 水浴10-15分钟以加速RNA的溶解。溶解液的加入量取决于样品的用量, 类型和所需的浓度。

下游分析

1. OD 测量

涡旋 RNA 样品, 吸取 1-2 µL RNA, 用 10 mM Tris, pH 7.4 稀释后用 NanoDrop 测吸光值。

- RNA 浓度(ng/µL)= OD₂₆₀ x 40 x 稀释倍数;
- RNA 的理想纯度: OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.9-2.1, OD₂₆₀/OD₂₃₀ =1.8-2.5;
- 若320nm 有较高的读数, 则OD₂₃₀、OD₂₆₀ 和OD₂₈₀ 必须都减去OD₃₂₀后, 再进行计算。