3. DNA 污染的去除

Nuclezol Reagent 可去除 95-99%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；
- 样品贮藏条件不正确，建议使用RNA*later* Reagent来保存固体组织样品。

2. DNA 的污染

- 上清液转移得太多；
- Nuclezol Reagent 的用量与组织用量关系不对；
- 匀浆不彻底，裂解液太粘稠；
- 样品中含有丰富的基因组DNA ，样品在Nuclezol Reagent裂解匀浆后，按1mL Nuclezol Reagent加入5 μL 冰醋酸，然后再加入BCP或氯仿抽提。
- 加入BCP或氯仿时没有剧烈振荡，或采用涡旋代替振荡；
- BCP或氯仿过量加入；
- 进行RT-PCR 时，建议使用DNase I 消化去除残留的DNA。

3. 纯度低 (OD260/OD280<1.65)

- Nuclezol Reagent的用量与组织用量关系不对；
- 加入BCP或氯仿时没有剧烈振荡，或采用涡旋代替振荡；
- BCP或氯仿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；
- 处理富含蛋白的样品如肝脏，用无水乙醇代替异丙醇，即在第6步加入等倍体积无水乙醇来沉淀RNA；
- 减少样品用量。

Nuclezol RNA Isolation Plus Reagent
一步法 RNA 抽提试剂

产品货号	包装规格
FP312-1	100 mL
FP312-2	200 mL
FP312-3	500 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

Nuclezol Reagent 是一款从细胞，组织及细菌中提取 RNA 的即用型试剂。**Nuclezol Reagent** 可快速裂解细胞/组织，RNA 释放至溶液中，并可快速灭活核酸酶，保护 RNA 不降解。经过 BCP 抽提后形成三相体系，其中 RNA 分布于水相层，DNA 和蛋白质分布于中间层和有机层，达到分离 RNA 的目的。**Nuclezol 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。此外，**Nuclezol Reagent** 还可以用于 DNA 和蛋白质的提取。

保 存 条 件

Nuclezol Reagent可在室温保存 12 个月。长期保存时建议在2~8ºC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 ºC保存。
- RNase-Free 的1.5 mL 离心管和枪头
- 匀浆工具
- 低温高速离心机(12,000 x g)

Nuclezol Reagent 的用量与组织的关系

样品类型	样品用量	TRIzol 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：样本的体积不能超过 **Nuclezol 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 **Nuclezol 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

1. 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 **Nuclezol 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 **Nuclezol Reagent**，涡旋充分打散样品。
- 贴壁细胞：彻底去除培养液，对10 cm^2 培养面积，加入1 mL **Nuclezol 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 10^7 细胞)，去除培养液。涡旋或用手指弹打松散细胞团。加入1 mL **Nuclezol Reagent**，移液枪吸打3-5次让细胞充分裂解。
- 细菌**:** 离心收集(1 x 10^8细菌)，加入100 µL Lysozyme裂解液处理10 分钟，然后加入1 mL **Nuclezol 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 **Nuclezol Reagent**，高速涡旋5-10分钟裂解真菌。

2. 室温放置3~5 分钟。
3. **(**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。
4. 按 1 mL **Nuclezol Reagent** 加入 100 µL BCP 或 200 µL 氯仿至裂解液中。用手剧烈振荡 15 秒，室温放置 3 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，BCP 或氯仿须按比例加入。若样品含有丰富的 DNA，按 1 mL **Nuclezol Reagent** 加入 5 µL 冰醋酸混匀后，再加 BCP 或氯仿或氯仿进行抽提。
5. 4°C，12,000 x g 离心 15 分钟。

   Note: 离心后会形成三相体系。上层为水相层含有 RNA，而 DNA 和蛋白质位于有机层(下层)和中间层。中间层的多少取决于样本类型，有些样品的中间层较少。
6. 小心转移上清液(~500 µL)至新的 1.5 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。

   Note: DNA 位于有机相和中间层。吸取上清液时，粘稠的基因组有可能会被吸到上清液中，轻柔的操作和转移少量上清液有利于减少 DNA 污染。加入异丙醇后，可在 4°C 沉淀过夜，-20°C 或-70°C 低温沉淀可能会引起盐析出，应尽量避免。处理富含蛋白质(如肝脏等)的样品时，用无水乙醇代替异丙醇可以提高 RNA 的纯度。
7. 4°C，12,000 x g 离心 10 分钟沉淀 RNA。
8. 倒弃上清液。加入 1 mL 75%乙醇，涡旋或颠倒混匀。
9. 4°C，7,500 x g 离心 5 分钟。
10. 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。
11. 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)= OD_{260} x 40 x 稀释倍数；
- RNA 的理想的纯度：OD_{260}/OD_{280}=1.9-2.1，OD_{260}/OD_{230} =1.8-2.5；
- 若320nm 有较高的读数，则OD_{230}、OD_{260} 和OD_{280} 必须都减去OD_{320}后，再进行计算。

2. 电泳分析

取 0.5-1 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 1 µg。