



总 RNA 提纯试剂盒 操作方法

1. 准备

估算 Redzol 或组织细胞的用量。每 1ml Redzol 的组织用量为 50~100mg; 细胞用量为 $5\sim 10\times 10^6$ 个细胞。

2. 组织或细胞的裂解

● 贴壁细胞

吸尽培养液, 加入 Redzol, 用枪反复吹打数次, 确保全部裂解, 然后转移至新的离心管中。裂解 10cm^2 细胞需要 1ml Redzol。

注: Redzol 的加入量不是根据细胞数目来决定, 而是根据细胞培养皿的面积 ($10\text{cm}^2/\text{ml}$) 来决定。

● 悬浮细胞

离心收集细胞, 吸尽液体, 加入 Redzol 用枪吹打数次, 确保全部裂解 (某些酵母和细菌要用匀浆器匀浆才能全部裂解), 然后转移至新的离心管中。按 1ml Redzol 可裂解 $5\sim 10\times 10^6$ 动物、植物、酵母细胞或 1×10^7 细菌细胞的比例加入 Redzol 裂解细胞。

注: 应避免在 Redzol 加入前洗涤细胞, 这样会增加 mRNA 降解的几率。

● 组织

先将新鲜组织剪成小块, 放入匀浆器内, 加入 Redzol 用匀浆器匀浆, 然后转移至新的离心管中。或者将组织在液氮中研磨成粉末后, 加入 Redzol 中。每 50~100mg 的组织加入 1ml Redzol 进行裂解。

注: 样品总体积不要超过所用 Redzol 体积的 10%。

3. 分相

1) 将匀浆液 $15\sim 30^\circ\text{C}$ 静置 5 分钟使其充分裂解。

2) 每 1ml Redzol 中加入 0.2ml 的氯仿, 震荡混匀后 $15\sim 30^\circ\text{C}$ 静置 2~3 分钟。

3) $2\sim 8^\circ\text{C}$ $12,000\text{g}$ 离心 15 分钟。离心后混合物分成三相 (下面的酚/氯仿相、中间的白色界面、上面的无色水相)。RNA 全部在无色的水相中。

注: 对于含有高浓度蛋白、脂肪、多糖或纤维素 (肌肉、脂肪组织、植物的微管组织) 的样品, 在分相前可以附加一个分离步骤: 匀浆后 $2\sim 8^\circ\text{C}$ $12,000\text{g}$ 离心 10 分钟弃沉淀。RNA 溶解在上清液中, 纤维素、多糖、大分子量的 DNA 以不溶的形式沉淀从而与 RNA 分离。



对于脂肪组织的样品,上面一层脂肪组织可以被清除掉,将清澈的匀浆液转移到另一新管中,继续进行第 3 步分相。

4. 沉淀 RNA

转移上层水相到另一新离心管中,按 0.5ml 异丙醇/1ml Redzol 比例加入异丙醇,充分混匀后 15~30℃静置 10 分钟,然后 2~8℃ 12,000g 离心 10 分钟, RNA 形成白色的小团沉淀在离心管的底部和侧面。

注:一定不要吸取中间界面;若同时提取 DNA 和蛋白质,于 4℃保留下层酚相。

5. 洗涤 RNA

弃上清, RNA 沉淀于管底。按 1ml 75%乙醇/1ml Redzol 加入 75%乙醇,漂洗 2~3 次 RNA 沉淀, 2~8℃ 7,500g 离心 5 分钟,尽量弃上清。

6. 溶解 RNA

在无菌工作台中干燥 RNA 沉淀 5~10 分钟。可用 DEPC 处理的 50μl H₂O、TE buffer 或 0.5% SDS 溶解 RNA 样品, 55-60℃温育 10 分钟使 RNA 完全溶解。

注: RNA 样品不要过于干燥,否则很难溶解。

常见问题解答

● 每 mg 组织或 10⁶ 培养细胞的 RNA 产率:

肝和脾:	6~10μg	肾:	3~4μg
骨骼肌和脑:	1~1.5μg	胎盘:	1~4μg
上皮细胞:	5~8μg	纤维原细胞:	5~7μg

● RNA 产率低

样品裂解或匀浆不完全;提取的 RNA 溶解不完全。

● A₂₆₀/A₂₈₀<1.65

紫外检测时 RNA 样品应用水稀释,不能用 TE 稀释,低盐离子溶液和低 pH 值溶液致使其在 280nm 的吸收值增加 (Wilfinger, W. et. AL, Biotechniques 22: 474-481; Fox, D.K.(1998) Focus 20: 2 p.37)。样品匀浆时加入试剂体积太少,匀浆后溶液分层不明显,水相被酚污染。最后提取的 RNA 样品不能完全溶解。

● RNA 降解

使用的动物组织没有被立即冻上或放入 Redzol 中匀浆;分离使用的样品或制备的 RNA 长期贮存在了 -5~-20℃,而不是贮存在 -60℃~-70℃。提取 RNA 的细胞被胰蛋白酶分解,易



导致提取的 RNA 降解。水相或使用的离心管没有完全处理仍残留有 RNase。变性凝胶电泳使用的甲醛 pH 值低于 3.5。

- **RNA 污染**

样品匀浆时加入试剂体积太少；分离使用的样品含有有机溶剂（乙醇，DMSO 等），盐离子或碱溶液。

- **蛋白多糖和多糖污染**

改进 RNA 沉淀方法：起始匀浆中每加 1ml 的 Redzol，水相中加入 0.25ml 的异丙醇和 0.25ml 的高盐溶液（0.8M 的柠檬酸钠，1.2M 的 NaCl），混匀，离心，接着进行下一步 RNA 的提取。此方法有效的沉淀了 RNA，而蛋白多糖和多糖仍保留在水相中。为了从多糖含量高的植物材料中获得高纯度的 RNA，推荐采用改进的 RNA 沉淀和起始匀浆液离心这些步骤。

北京赛百盛基因技术有限公司

全国统一热线：400 666 3029

地址：北京市海淀区上地四街 1 号院 2 号楼 202 室 邮编：100085

电话：010-62969345/46, 010-82784296/92 传真：010-82784290

Email: info@sbsbio.com

<http://www.sbsbio.com>