

MagZol BD Reagent

Cat.No. R4803-02 (200ml), R4803-01 (50ml)

简介

MagZol BD Reagent 为单一相溶液，含异硫氰酸胍和酚。本产品是在酸性酚异硫氰酸胍 RNA 提取方案的基础上改良而成的 (Piotr Chmuczynski, 1987)。与传统 Trizol 方法相比，本产品使用方法简单，无需氯仿抽提分层，且全程可以在常温进行。MagZol BD Reagent 可快速裂解细胞/组织，RNA 释放至溶液中，并快速灭活核酸酶，保护 RNA 不降解，加入无酶水抽提后，DNA 和蛋白质沉淀于管底，达到分离 RNA 的目的。MagZol BD 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

MagZol BD Reagent 室温运输，收到后于 2-8°C 保存，保质期为 18 个月。

准备工作

- 异丙醇
- 75%乙醇(DEPC 处理水配制)
- DEPC 处理水或 RNase Free Water
- RNase-Free 的 1.5ml 离心管和枪头
- 500 μ l MagZol BD Reagent 最多可以裂解 50 mg 常规组织，过多样本量可能会导致裂解不充分，并使产物纯度降低。部分韧性极强或含较多外基质组织，可能会出现不能完全溶解的现象，不会影响后续 RNA 提取及 RNA 质量。
- 用机器匀浆器匀浆时，可将新鲜组织尽量剪碎浸泡在 MagZol BD Reagent 中，用电动匀浆器高速匀浆至组织块彻底裂解；推荐先将新鲜组织充分浸泡在 RNAsafer Reagent (Cat.No 4801)中先失活 RNase，再加入 MagZol BD Reagent 和电动匀浆器匀浆至彻底裂解。

操作流程

1. 按下列方法对样品进行匀浆

- **动物组织**：取 20-50mg 动物组织到离心管中，加入 0.5ml MagZol BD Reagent，立即用研磨杵或匀浆器进行充分匀浆。肝脏、脾脏、肾脏等内脏样品富含 RNA 和蛋白质，建议把样品量控制在 15-25mg。
- **动植物组织**：用液氮将动植物样品磨成粉末状，取 20-50mg 样品至离心管中，立即加入 0.5ml MagZol BD Reagent，涡旋充分打散样品。

- **贴壁细胞**：去除培养液，用 PBS 清洗一次。对于六孔板（直径 3.5cm），每孔加入 0.5ml MagZol BD Reagent，用移液枪反复让细胞裂解并脱落下来。
对于 10cm² 面积的培养瓶，加入 2ml MagZol BD Reagent。
 - **悬浮细胞**：离心收集细胞(<5 x 10⁶ 细胞)，用 PBS 清洗一次再离心，吸弃残液。涡旋或弹打松散细胞。加入 0.5ml MagZol BD Reagent，用移液枪反复吸打让细胞充分裂解。
 - **细菌**：离心收集(1 x 10⁸ 细菌)，加入 50 μ l Buffer TE/lysozyme (货号 Ly-100)放置 10 分钟，然后加入 0.5ml MagZol BD Reagent，涡旋 1 分钟。
 - **微量真菌/微生物**：离心收集真菌或细菌，加入 0.5ml MagZol BD Reagent 和 300mg 玻璃珠 (0.1-0.6cm)，高速涡旋 10 分钟珠磨裂解微生物。
2. 按 0.5ml MagZol BD Reagent 加入 200 μ l RNase-Free Water 或 DEPC 处理水，上下颠倒混匀，室温放置 5 分钟。
 3. 室温，12,000 x g 离心 15 分钟。
离心后上层水相含 RNA，DNA 和蛋白质位于深色沉淀中。水相含有少量的颜色是正常的。
 4. 转移 500 μ l 上清液至新的 1.5ml 离心管中，加入等倍体积异丙醇，上下颠倒混匀，室温静置 10 分钟。
水相体积约占总体积的 90%，用 500 μ l MagZol BD Reagent 进行提取时，上层水相约为 640 μ l，建议只转移 500 μ l。进行微量样本提取可以全部转移上清以提高产量。处理少量样本时，离心后可能不会出现下层沉淀，属于正常现象，可继续按后续步骤完成提取。
 5. 室温，12,000 x g 离心 10 分钟沉淀 RNA，小心倒弃上清液。
受离心机角度和杂质影响，离心后 RNA 沉淀可能不能聚集于管底而分散在管壁上，小心沿液面缓慢吸弃试剂。
 6. 加入 500 μ l 75%乙醇 (DEPC 处理水配制)，涡旋或轻弹离心管重悬沉淀，再颠倒混匀几次，8,000 x g 离心 3 分钟，小心倒弃上清液。
可选，重复第 6 步一次。
 7. 短暂离心，小心吸弃所有残液，空气干燥 5 分钟。
 8. 加入适量 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。
溶解液的加入量取决于样品的用量，类型和所需的浓度。溶解后的 RNA 短期保存时，可以放置于-20~-30°C，长期保存时，放置于-70~-80°C。

下游分析

1. OD 测量

涡旋 RNA 样品，吸取 1-2 μ l RNA，用 10Mm Tris, pH7.4 稀释 20-100 倍，于紫外分光光度计测量 230nm(盐)、260nm(核酸)、280nm(蛋白)和 320nm(不溶物或背景)的吸光值。

- RNA 浓度($\text{ng}/\mu\text{l}$)= $\text{OD}_{260} \times 40 \times$ 稀释倍数；
- RNA 的理想纯度： $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.9-2.1$ ， $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}=1.8-2.5$ ；
- 若 320nm 有较高的读数，则 OD_{230} 、 OD_{260} 和 OD_{280} 必须都减去 $\text{OD}_{320\text{nm}}$ 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 。

3. DNA 污染的去 除

MagZol BD Reagent 可去除 95%DNA 污染。多数应用，如 Northern 杂交，Poly (A)富集等无需处理。由于 PCR 敏感高，对单拷贝数的基因都可能被扩增，若纯化的 RNA 用于 RT-PCR，建议使用 DNase 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 RNASafer Reagent 来保存组织样品；

2. DNA 的污染

- 上清液转移得太多；
- MagZol BD Reagent 的用量与组织用量关系不对；
- 匀浆不彻底，裂解液太粘稠；
- 进行 RT-PCR 时，建议使用 DNase I 消化去除残留的 DNA。

3. 纯度低($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}<1.65$)

- 裂解不够充分，匀浆后须室温放置 5 分钟；
- 减少样品用量；