

产品概述

Brizol Reagent 是广谱型总 RNA 提取试剂。产品适用范围广泛, 可以从病毒、动物组织、血液、植物材料、各种微生物及培养细胞等样品中提取总 RNA。本品能够有效抑制 RNase 活力, 有效提取样本中的总 RNA, 最大限度的消除了 DNA 和蛋白质等杂质的污染, RNA 样本的完整性高, 可用于各种分子生物学常规实验, 如 RT-PCR、Real-time RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译、PolyA 筛选、RNase 保护分析、高通量测序和分子克隆等。

试剂组成

Components	BR2B101 100 mL/瓶
Brizol Reagent	100 mL

保存条件

2-8°C 存储。

自备试剂

异丙醇、氯仿、75%乙醇、RNase-Free ddH₂O。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途, 不用于临床诊断。
2. Brizol Reagent 含有毒物质苯酚, 避免接触皮肤或吸入。为防止溅入眼睛, 请戴防护眼镜或使用透明保护屏。若皮肤接触 Brizol Reagent, 请立即用清水冲洗, 如仍有不适, 请立即送医。
3. 请佩戴一次性手套和口罩操作, 以防 RNase 污染。
4. 所有离心管, 枪头及相关器具都必须无 RNase 污染。玻璃器物可 150°C 烘烤 4 h 以去除 RNase, 塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 min, 然后用水彻底清洗, 再灭菌, 即可去除 RNase。
5. 如果不能及时抽提 RNA, 样品用 Brizol Reagent 匀浆后, 可置于 -70°C。
6. 如果用于 RT-PCR 或 Real-time RT-PCR, 即使有少量 DNA 基因组也会影响实验结果, 后续可加入 DNaseI 进行处理。
7. 使用冻存的细胞或组织抽提总 RNA 的效果通常比新鲜的细胞或组织差一些, 因为在细胞或组织冻融过程中一些细胞或组织内的 RNase 会被释放出来并剪切样品。
8. 配制溶液应使用 RNase-Free ddH₂O。

操作步骤

1. 样本处理
 - a. 植物组织: 取新鲜植物组织在液氮中充分研磨或将叶片剪碎后直接在 Brizol Reagent 中研磨, 研磨要迅速。约 15 mg-50 mg 组织加入 1 mL Brizol Reagent。
 - b. 动物组织: 先将组织剪切成小块, 放入玻璃匀浆器内。每 15 mg-50 mg 组织加入 1 mL Brizol Reagent 匀浆。样品体积一般不超过 Brizol Reagent 体积的 10%。对于 RNA 完整性要求比较高的情况, 推荐液氮冷冻组织块, 在低温下用研钵研碎组织, 再加入 Brizol Reagent 进行总 RNA 抽提。
 - c. 贴壁细胞: 离心收集细胞, 每 10 平方厘米细胞加入 1 mL Brizol Reagent。一般六孔板每孔加 1 mL Brizol Reagent, 12

孔板每孔加 0.5 mL Brizol Reagent。晃动 3-5 下,再用移液器吹打 2-3 下,确保全部裂解,然后吸至离心管中。细胞也可加入含有 0.1%-0.25%胰蛋白酶的 PBS 缓冲液处理细胞,当细胞脱离容器壁时,加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶,将细胞溶液转移至 RNase-free 的离心管中,于 3000 rpm 4°C 离心 5 min,收集细胞沉淀,仔细吸除所有上清。

注意:收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净,否则会导致裂解不完全,造成 RNA 的产量降低。

d.悬浮细胞:离心收集细胞, $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 个/mL 动植物细胞、酵母或细菌加入 1 mL Brizol Reagent。用移液器吹打,确保全部裂解。某些酵母和细菌若裂解不充分,可用匀浆器匀浆,确保全部裂解。

注意:加入 Brizol Reagent 前不要洗涤细胞,以免降解 mRNA。

e.血液与病毒液处理:直接取新鲜的血液或病毒液,加入 3 倍体积 Brizol Reagent。(推荐 0.2 mL 全血或病毒液加入 0.6 mL Brizol Reagent)。

2. 根据不同样本加入适当体积的 Brizol Reagent 后,室温放置 5 min,使样品充分裂解。

3. 可选步骤:于 4°C 12,000 rpm 离心 10 min,取上清。

注意:如果样品中含有较多蛋白、脂肪、多糖或肌肉、植物结节部分等,可离心去除。离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量 DNA,上清中含有 RNA。处理脂肪组织样品时,上层是大量油脂,应除去。取澄清的匀浆溶液进行下一步操作。

4. 每毫升 Brizol Reagent 加入 0.2 mL 氯仿,移液器吹打混匀,室温放置 2-3 min。

注意:旋涡混匀或手动快速颠倒混匀 15 s。

5. 于 12,000 rpm 4°C 离心 15 min,样品会分成三层:紫红色的有机相,中间层和上层无色的水相,吸取含总 RNA 的上层无色水相至一新的离心管中。

6. 在得到的水相中加入等体积的异丙醇,颠倒数次混匀,室温沉淀 10 min。如果希望提取 microRNA 等小 RNA,推荐-70°C 沉淀过夜。

7. 于 12,000 rpm 4°C 离心 10 min,在管底可见 RNA 沉淀,弃上清。

8. 加入 1 mL 75%乙醇 (RNase-Free ddH₂O 配制),颠倒混匀。

9. 于 12,000 rpm 4°C 离心 5 min,弃上清,注意不要倒出沉淀,剩余的少量液体短暂离心,然后用移液器吸出。

10. 室温放置晾干 2-3 min,根据实验需要加入 30-100 μ L RNase-Free ddH₂O,反复吹打、混匀,充分溶解 RNA, -70°C 冻存。(切勿让 RNA 过分干燥,否则将极难溶解,且测出的 A_{260}/A_{280} 值会低于 1.6)。

FAQ

1. 低得率: a. 样品裂解或匀浆处理不彻底。 b. 得到的 RNA 沉淀未完全溶解。

2. $A_{260}/A_{280} < 1.65$: a. 检测吸光度时, RNA 样品不是溶于 TE, 而是溶于水。 b. 样品匀浆时加的试剂量太少。 c. 匀浆后样品未在室温放置 5 min。 d. 水相中混有有机相。 e. 最后得到的 RNA 沉淀未完全溶解。

3. RNA 降解: a. 组织取出后没有马上处理或冷冻。 b. 样品或提取的 RNA 沉淀未在-70°C 保存。 c. 细胞在胰蛋白酶处理时被破坏。

d. 溶液或离心管未经 RNase 去除处理。

4. DNA 污染: a. 样品匀浆时加的试剂体积太少。 b. 样品中含有组织溶剂 (乙醇, DMSO), 强缓冲液或碱性溶液。

5. 蛋白和多糖污染: a. 样品中蛋白、多糖含量高。 b. 样品量太大, 可加大试剂用量。 c. 水相中混有有机相。