

## MaBol™ Reagent

溶液型纯化系统

本产品可快速裂解细胞/组织，让 RNA 释放至溶液中，同时试剂中的异硫氰酸胍和酚可快速失活核酸酶，保护 RNA 不降解。经过氯仿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。MaBol™ 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，MaBol™ Reagent 还可以用于 DNA 和蛋白质的提取。

Cat: MLR002

通用型 RNA 溶液纯化系统

(Universal RNA Extraction System)

User Guide

广州迈宝生物科技有限公司

网址: [WWW.mabiotech.cn](http://WWW.mabiotech.cn)

## 产品组份

产品编号	MLR002-01	MLR002-02	MLR002-03
MaBol Reagent	100 ml	200 ml	500 ml

## 保存条件

本产品室温运输。收到试剂后于 2-8°C 保存。保质期为一年。

## 准备事项

- 氯仿
- 异丙醇
- DEPC 处理水的配制 70%乙醇
- DEPC 处理水或 Nuclease Free Water
- RNase-Free 的 1.5ml 离心管和枪头
- 低温高速离心机(12,000xg)

## 实验步骤

### 样品匀浆和裂解

#### 1. 按下列方法对样品进行匀浆:

- **动物组织:** 称取 10-100mg 动物组织到离心管中, 加入 1ml MaBol 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 10-100mg 的样品至离心管中, 立即加入 1ml MaBol Reagent, 涡旋充分打散样品。
- **贴壁细胞:** 彻底去除培养液, 对 10cm<sup>2</sup> 培养面积, 加入 1ml MaBol Reagent, 移液枪吸打 5-10 次, 让细胞充分裂解。
- **悬浮细胞:** 500xg 离心收集细胞(<1 x 10<sup>7</sup> 细胞), 去除培养液。涡旋或用手指弹打松散细胞团。加入 1ml MaBol Reagent, 移液枪吸打 5-10 次让细胞充分裂解。
- **细菌:** 离心收集(1 x 10<sup>8</sup> 细菌), 加入 100μl lysozyme/TE(50mg/ml)处理 10 分钟, 然后加入 1ml MaBol Reagent, 涡旋 1 分钟。
- **微量真菌:** 转移<10mg 真菌样品至 2ml 真菌/细菌样品研磨管(可另外购置)中, 加入 1ml MaBol 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。

注：处理富含蛋白质或难裂解的组织样本时，匀浆后仍可能存许多不溶解的物质。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。

## 抽提分层

4. 加入 200µl 氯仿至裂解液中。用手剧烈振荡 15 秒；室温放置 3 分钟。

注：用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿必须按比例加入，过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中，导致 RNA 的纯度下降。若样品含有丰富的 DNA，按 1ml MaBol Reagent 加入 5µl 冰醋酸混匀后，再加入氯仿进行抽提。

5. 4°C, 12,000 x g 离心 15 分钟。

注：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，有些样品的中间层非常少。

## RNA 沉淀

6. 小心转移上清液(~500µl)至新的 1.5ml 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。

注：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，轻柔的操作和只转移少量上清液有利于减少 DNA 污染。加入异丙醇后，RNA 可在 4°C 放置过夜，-20°C 或 -70°C 低温沉淀可能会引起盐析出，尽量避免。由于异硫氰酸胍对 RNA 有一定的损伤作用，不建议长期放置该混合液。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。

## 乙醇脱盐

8. 倒弃上清液。加入 1ml 75%乙醇。涡旋或颠倒混匀。

注：若 RNA 需要长期保存，最好在这一步中保存。加入 75%乙醇后，RNA 可在 4°C 保存一个月，或-20°C 保存一年以上。

9. 4°C, 7,500 x g 离心 5 分钟。

## RNA 的溶解

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。

注：倒弃上清液后，若管壁上仍残留较多的液体，可再短暂离心 1-2 分钟后，用 10-100µl 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 DEPC 处理水至 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。

注：若 RNA 比较难于溶解，可用移液枪吹打沉淀以加速 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

### 电泳分析

取 0.5-1 $\mu$ g 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 0.8 $\mu$ g。

## 问题回答

### 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；

### 2. DNA 的污染

- 上清液转移得太多；
- MaBol Reagent 的用量与组织用量关系不对；
- 匀浆不够彻底，裂解液太粘稠；
- 样品中含有丰富的基因组 DNA，样品在 MaBol Reagent 裂解匀浆后，按 1ml MaBol Reagent 加入 5  $\mu$ l 冰醋酸，然后再加入氯仿抽提。
- 加入氯仿时没有剧烈振荡，或采用涡旋代替振荡；
- 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)

- MaBol Reagent 的用量与组织用量关系不对；
- 加入氯仿时没有剧烈振荡，或采用涡旋代替振荡；
- 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；