

MagZol LS Reagent

Cat: R4802-01, 100 ml Cat: R4802-02, 200 ml

简介

MagZol™ LS Reagent 为单一相的溶液，含有异硫氰酸胍和酸性酚。该试剂是在一步法酸性酚异硫氰酸胍 RNA 提取方案的基础上改良而成的 [Piotr Chemczycchi, 1987]。MagZol™ LS Reagent 是专门为液体样品的 RNA 提取而设计。它能快速地裂解细胞，让 RNA 释放至溶液中，同时试剂中含有的异硫氰酸胍和酚可快速失活各种核酸酶，保护 RNA 不发生降解。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，从而达到分离 RNA 的目的。MagZol™ LS Reagent 适合于从各种液体样品中快速提取总 RNA、病毒 RNA 或游离 RNA。使用该方法纯化的 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 LS Reagent 室温运输。收到试剂后请放置 2-8°C 保存。保质期为 18 个月。

准备工作

- 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)
- MagZol LS Reagent 用量与样品的关系 (如下)

样品类型	样品用量	MagZol LS Reagent 用量
组织样品	<10mg	0.6ml + 0.2 ml water
	10-100mg	0.75ml + 0.25 ml water
贴壁细胞	培养面积 10cm ²	0.75ml + 0.25 ml water
	10 ² -10 ⁵ 细胞*	0.6ml + 0.2 ml water
悬浮细胞	5-10 × 10 ⁶ 细胞	0.75ml + 0.25 ml water
全血样本	250 μl	0.75ml + 5μl 冰醋酸
血清、血浆	250 μl	0.75ml
无细胞样品	250 μl	0.75ml

注：样本的体积不能超过 MagZol™ LS Reagent 体积的 33%。细胞提指动物、酵母、植物细胞。样品在 MagZol™ LS Reagent 充分匀浆后，可在 -80°C 长期保存保存，-20°C 保存三个月以上。2-8°C 保存一周。

操作流程 (以 0.75ml MagZol LS Reagent 为例)

1. 根据样品类型对样品进行前处理。
 - **液体样品的处理：转移 0.75ml MagZol LS Reagent 至 1.5ml 离心管中，加入 0.25ml 的液体样品，如血清、尿液、血浆、或全血等。**若样品不足 0.25ml，加入 DEPC 处理水补足至 0.25ml，涡旋混匀，然后按第二步进行操作。
全血样品含有大量的蛋白质，最好将全血稀释一倍再进行处理。全血加到裂解液后，应立即快速吸打 10-20 次，以防止样品团聚。若只需提取病毒 RNA 时，样品于 500 x g 离心 10 分钟去除细胞后取上清再进行提取。处理无细胞的液体样品或 RNA 含量很低的样品时，加入 10μl Linear Acrylamide (5mg/ml) 至裂解液中，可以提高 RNA 的得率和稳定性。
 - **固体样品的处理：按下列方法对样品进行匀浆：取 0.75ml MagZol LS Reagent，加入 0.25ml DEPC 处理水稀释后，再按如下步骤处理固体样品，然后按第二步进行操作。**
动物组织：称取 10-100mg 动物组织到离心管中，加入 1 ml MagZol™ LS Reagent 释稀液，立即用研磨杵或机器匀浆器进行充分匀浆。动物组织样品也可以用液氮进行研磨 (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 1 ml MagZol™ LS Reagent 释稀液，涡旋打散样品。
贴壁细胞：彻底去除培养液，对 10cm² 培养面积，加入 1 ml MagZol™ LS Reagent 释稀液，移液枪吸打 3-5 次，让细胞充分裂解。
悬浮细胞：500xg 离心收集细胞 (<1 × 10⁷ 细胞)，去除培养液。涡旋或用手指弹打松散细胞沉淀团。再加入 1 ml MagZol™ LS Reagent 释稀液，移液枪吸打 3-5 次让细胞充分裂解。
2. 室温放置 3-5 分钟。
3. (可选) 4°C，12,000 x g 离心 5 分钟，转称上清液至新的离心管中。
注：处理富含蛋白质固体样品或全血样品不要省略此步。无细胞液体样品无需这一步处理。
4. 按 0.75ml MagZol LS Reagent 加入 200μl 氯仿或 100μl Buffer BCP 至裂解液中。用手上下快速振荡 15 秒，室温放置 3 分钟。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，氯仿须按比例加入，过多的氯仿会使 DNA 和蛋白质回到水相中，导致 RNA 的纯度下降。由于氯仿挥发性强，毒性较大，可用 100μl BCP (1-Bromo-3 chloropropane) 代替。若样品含有丰富的 DNA，按 1ml MagZol 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。

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 μ l)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。

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 $^{\circ}$ C 沉淀过夜，-20 $^{\circ}$ C 或-70 $^{\circ}$ C 低温沉淀可能会引起盐析出，应尽量避免。由于异硫氰酸胍对 RNA 有一定的损伤作用，不建议长期放置。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 $^{\circ}$ C，12,000 x g 离心 10 分钟沉淀 RNA。

8. 倒弃上清液。加入 1ml 75%乙醇，涡旋或颠倒混匀。

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 $^{\circ}$ C 保存一个月，或-20 $^{\circ}$ C 保存一年以上。

9. 4 $^{\circ}$ 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 5~10 分钟。

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 μ l 的枪头小心吸弃残液，空气干燥 3~5 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。

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 $^{\circ}$ 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 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(ng/ μ l)= OD260 x 40 x 稀释倍数；
- RNA 的理想纯度：OD260/OD280=1.9-2.1，OD260/OD230 =1.8-2.5；
- 若 320nm 有较高的读数，则 OD230、OD260 和 OD280 必须都减去 OD320nm 后，再进行计算。

2. 电泳分析取 0.5-1 μ 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 1 μ g。

3. DNA 污染的去

MagZol LS 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. 处理不同组织时，RNA 的产量如何？

组织类型	每 mg 样本 RNA 产量
肝脏、脾脏	6-10 μ g
肾脏	3-4 μ g
肌肉、脑组织	1-1.5 μ g
胎盘	1-4 μ g
肺组织	1.5-2 μ g

2. 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 来保存固体组织样品；

3. DNA 的污染

- 上清液转移得太多；
- MagZol 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 MagZol Reagent 裂解匀浆后，按 1ml MagZol Reagent 加入 5 μ 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。

4. 纯度低(OD260/OD280<1.65)

- MagZol 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；
- 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；
- 建议使用 HiPure Universal RNA Kit 提取样品的 RNA，可明显提高纯度；