

MagZol Reagent (Trizol Reagent)

Cat.No. R4801-01(100ml) R4801-02(200ml) R4801-03(500ml)

简介

MagZol 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 Chmeczychi, 1987)。MagZol Reagent 可快速裂解细胞/组织，RNA 释放至溶液中，并可快速灭活核酸酶，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。MagZol 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，MagZol Reagent 还可以用于 DNA 和蛋白质的提取。

保存条件

MagZol Reagent 室温运输。收到后于 2-8°C 保存，有效期 18 个月。

准备工作

- 氯仿
- 异丙醇
- 70%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
- 匀浆工具
- 低温高速离心机(12,000 x g)
- MagZol Reagent 的用量与组织的关系

样品类型	样品用量	MagZol Reagent 用量
组织样品	<10mg	0.8ml+100µg Glycogen
	10-100mg	1 ml
贴壁细胞	培养面积 10cm ²	1ml
悬浮细胞	10 ² -10 ⁵ 细胞*	0.8ml+100µg Glycogen
	5-10 x 10 ⁶ 细胞	1 ml
全血	100 ul	1 ml

注：样本的体积不能超过 MagZol™ Reagent 体积的 10%。细胞提指动物、酵母、植物细胞。Glycogen 需另外购买，使用时，请用 DEPC 配制成 20mg/ml。样品在 MagZol™ Reagent 中充分匀浆后，可在 4°C 保存 3 天，-20~-80°C 保存六个月以上。

操作流程

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 MagZol 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 30-100mg 样品至离心管中，立即加入 1ml MagZol Reagent，涡旋充分打散样品。
 - **贴壁细胞：**彻底去除培养液，对 10cm² 培养面积，加入 1ml MagZol Reagent，移液枪吸打 3-5 次，让细胞充分裂解。
 - **悬浮细胞：**500 x g 离心收集细胞(<1 x 10⁷ 细胞)，去除培养液。涡旋或用手指弹打松散细胞团。加入 1ml MagZol Reagent，移液枪吸打 3-5 次让细胞充分裂解。
 - **细菌：**离心收集(1 x 10⁸ 细菌)，加入 100µl TE/lysozyme (3mg/ml)处理 10~15 分钟，然后加入 1ml MagZol Reagent，涡旋 1 分钟。
 - **微量真菌：**转移<50mg 真菌样品至 2ml 匀浆管中，加入 1ml MagZol Reagent，高速涡旋 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 5 分钟。转移上清液至新的离心管中。

处理富含蛋白质或难裂解的组织样本时，匀浆后仍可能存在不溶解的物质。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。
4. 按 1ml MagZol 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，过多的氯仿会迫使 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(~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。

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°C 沉淀过夜，-20°C 或 -70°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°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°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。
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 10~100µl 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°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 1-2µl 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/µl)= 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 都必须减去 OD320nm 后，再进行计算。

2. 电泳分析

取 0.5-1µg 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 1µg。

3. DNA 污染的去除

MagZol 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	6-10µg
肾脏	3-4µg
肌肉、脑组织	1-1.5µg
胎盘	1-4µg
肺组织	1.5-2µg

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 µl 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；