

## 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 (Piort Chmeczychi, 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。保质期为一年。

### 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 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 <sup>2</sup>	0.75ml + 0.25 ml water
	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup> 细胞*	0.6ml +0.2 ml water
悬浮细胞	5-10 x 10 <sup>6</sup> 细胞	0.75ml + 0.25 ml water
全血样本	250 μl	0.75ml
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 为例)

#### 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 处理水至总体积为 1ml。涡旋混匀，然后按第二步进行操作。

注：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 5,000 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:

1. **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 10cm<sup>2</sup> 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 x 10<sup>7</sup> 细胞)，去除培养液。涡旋或用手指弹打松散细胞沉淀团。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。转称上清液至的新的离心管中。

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。

#### 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：用涡旋取代振荡混匀会造成基因组 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。由于氯仿挥发性强，毒性较大，可用 100 $\mu$ l BCP (1-Bromo-2 chloropropane) 代替。处理全血样品，加入 5 $\mu$ l 冰醋酸至裂解液中可减少 DNA 的污染。

5. 4 $^{\circ}$ 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(~500 $\mu$ l)至新的离心管中。加入等倍体积(~0.5ml)异丙醇。颠倒混匀，室温放置 10 分钟。

注：由于 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。处理 RNA 含量很低的样品，加入异丙醇后，RNA 可在-20 $^{\circ}$ C 放置 1 小时或过夜。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。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纯度。若样品中 RNA 含量很低，建议-20 $^{\circ}$ C 放置 1 小时。

7. 4 $^{\circ}$ C, 12,000 x g 离心 15 分钟沉淀 RNA。

#### 乙醇脱盐

8. 倒弃上清液。加入 1ml 80%乙醇。涡旋或颠倒混匀。

注：加入 80%乙醇后，RNA 可在 4 $^{\circ}$ C 保存一个星期，或-20 $^{\circ}$ C 保存一年。

9. 4 $^{\circ}$ C, 12,000 x g 离心 10 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。可短暂离心后，再用 10-100 $\mu$ l 的枪头吸弃残留的液体。再空气干燥 5-10 分钟。真空干燥或长时间干燥会导致 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。

注：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。

### 下游分析

#### 1. OD 测量

涡旋 RNA 样品，吸取 1-2 $\mu$ l RNA，用 Buffer TE (10Mm Tris, pH7.0, 1Mm EDTA) 稀释 20-50 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/ $\mu$ 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 $\mu$ g RNA 上样于 1.0%琼脂糖凝胶，5V/cm 电泳 15-30 分钟。

#### 3. DNA 污染的去路；

MagZol™ LS Reagent 可去除 95-99%的基因组 DNA 污染。对于大多数的应用，如 Northern 杂交，Poly (A) 富集等都不需进行处理。由于 PCR 敏感高，对单拷贝数的基因也都有可能被扩增，若纯化的 RNA 是用于 RT-PCR，我们建议必须使用 DNase I 消化，才能彻底去除 DNA 的污染。

### 问题回答

#### 1. MagZol™ LS Reagent 处理不同组织时，RNA 产量如何？

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

#### 3. DNA 的污染

- 上清液转移得太多；
- MagZol™ LS 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；
- 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™ LS 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 0.5ml 无水乙醇来沉淀 RNA。