

NGzol总RNA快速提取试剂盒

货号： NG304S 50次

NG304M 100次

试剂盒组成	50次	100次
裂解液RL (4℃避光)	50 ml	100ml
去蛋白液RE	25 ml	50ml
漂洗液RW	10 ml	25ml
	第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free Water	10 ml	20ml
RNase-free吸附柱RA	50个	100个
收集管 (2ml)	50个	100个

储存事项:

- 1.运输和储存均在室温下 (15℃ - 25℃) 进行。裂解液RL可以常温运输，收到后4℃避光可长期保存，常温保存3个月也不影响使用质量。
- 2.避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

产品介绍：

改进的异硫氰酸胍/酚一步法 (NGzol法) 裂解细胞和灭活RNA 酶，然后总RNA在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗 - 离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的RNase free water将纯净RNA从硅基质膜上洗脱。

产品特点：

- 1.离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
- 2.结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
- 3.独有的RL裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
- 4.多次漂洗去蛋白过程，提取RNA纯度更高。
- 5.有效的去除了5S在总RNA中含量，提高了纯度。

注意事项：

- 1.第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入!
- 2.本试剂盒抑制RNA酶效果极佳，所有离心步骤如未加说明，均可在常温进行。
- 3.裂解液RL和去蛋白液RE中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- 4.考虑到环保问题，本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，使用前需要自备氯仿。
- 5.常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析RNA的质量。好的RNA产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体RNA带，分别为~5Kb (28S)，~2Kb (18S)，条带亮度比值约为2:1。有时候也可以看到~0.1kb和0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到4, 5条带也属于正常现象，如果RNA未成熟的前体或者不均一核RNA、小核RNA提取出来也可能看到介于7Kb和15Kb之间的不连续的高分子量条带。
- 6.检测OD260/OD280吸光度比值时，如需稀释RNA样品应该用TE (PH 8)，如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和PH值低，会使OD280升高，从而使比值降低。
加入裂解液RL匀浆后，加氯仿前，样品可在 -60℃-70℃ 保存一个月以上。

操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

⇨ **提示：第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入指定量无水乙醇！**

1. 匀浆处理

1. 组织

将组织在液氮中磨碎，每50~100 mg组织加1 ml 的裂解液RL后匀浆。组织样品容积不能超过RL容积的10%。

2. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入1 ml 的RL溶解细胞，并用移液枪轻轻吹打混匀。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的RL量（每10 cm²加1 ml）。一般情况下，普通大小的细胞培养瓶，加入1 ml的RL，迅速轻摇使RL充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活RNA酶，轻轻用移液枪反复吹打混匀。当RL量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

3. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞，小心弃上清。每5~10×10⁶的动物细胞，植物细胞加1ml的RL。在RL试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。在加入RL前应避免洗涤细胞，否则会增加mRNA降解的可能性。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀，在15 -30℃条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。

3. **可选步骤**：4℃ 12,000 rpm 离心10 min，小心取上清转入一个新的RNase free的离心管中。当样品富含蛋白质、脂肪、多糖或是细胞外物质例如肌肉、脂肪组织或植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在2~8℃ 12,000 rpm离心10 min，移除匀浆中不溶解的物质，余下的沉淀中包含有细胞外膜、多糖、以及高分子量DNA，而上层的超浮游物含有RNA。

4. 每1 ml RL加0.2 ml 氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡15 sec并将其在室温下孵育3 min。

5. 于4℃ 12,000 rpm 离心10 min，样品会分成三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相，RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加RL体积的50%，把水相小心转移到新管中（不要触碰中间层），记录水相体积。

6. 加入水相体积一半也就是0.5倍体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱RA中（吸附柱套在收集管内，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱RA中，请分两次转入吸附柱RA中。）
，12,000 rpm 离心45 sec，弃废液，将吸附柱重新套回收集管。

7. 加500 μl 去蛋白液RE，12,000 rpm离心45 sec，弃废液。

8. 加入500 μl 漂洗液RW（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心45 sec，弃废液。

9. 重复步骤8一次。

10. 将吸附柱RA放回空收集管中，12,000 rpm离心2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

11. 取出吸附柱RA，放入新RNase free离心管中，根据预期RNA产量在吸附膜的中间部位加50-80 μl RNase free water，室温放置2 min，12,000 rpm 离心1 min。如果需要较多RNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心1 min，或者另外再加30 μl RNase free water，离心1 min，合并两次洗脱液。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要RNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于30 μl，体积过小降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。