

VeZol Reagent

R411



使用说明书

Version 23.1

目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	02
05/自备材料	02
06/注意事项	02
07/实验原理与流程概要	03
08/实验流程	04
08-1/样本处理	04
08-2/总RNA提取	05
09/常见问题与解决方案	06

01/产品概述

VeZol Reagent适用于从多种培养细胞、动物组织、植物组织等样本中分离出高质量的Total RNA。VeZol Reagent是基于苯酚和异硫氰酸胍组成的单相溶液，搭配优化后的专有成分，裂解样本和抑制RNase能力更强。VeZol Reagent快速裂解样本，经氯仿抽提后，分为上清层(含RNA)、中间层和红色的有机层，用异丙醇沉淀、乙醇洗涤得到产量和纯度高的Total RNA。获得的Total RNA可以直接用于RT-PCR、qRT-PCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译和高通量测序等分子生物学实验。

02/产品组分

组分	R411-01	R411-02
VeZol Reagent	100 ml	200 ml

03/保存条件

2 ~ 8℃避光保存，室温运输。

04/适用范围

适用于多种培养细胞、动物组织、植物组织。

05/自备材料

氯仿，异丙醇，75%乙醇(RNase-free ddH₂O配制)，RNase-free ddH₂O，RNase-free离心管，RNase-free糖原(可选)。

06/注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。

1. 本产品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性，使用时应穿戴防护物品，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不慎接触到眼睛，应立即用大量的清水冲洗并前往医院治疗；接触到皮肤，请立即用大量去垢剂和清水冲洗，如仍有不适，请前往医院治疗。
2. RNA提取的关键在于防止RNase污染。RNase在环境中普遍存在，且极其稳定，微量的RNase即可迅速降解RNA，因此，请按照常规RNA提取操作来做好防护措施，包括佩戴口罩和一次性灭菌手套，在单独的洁净区域操作，使用RNase-free的实验器具等。

07/实验原理与流程概要

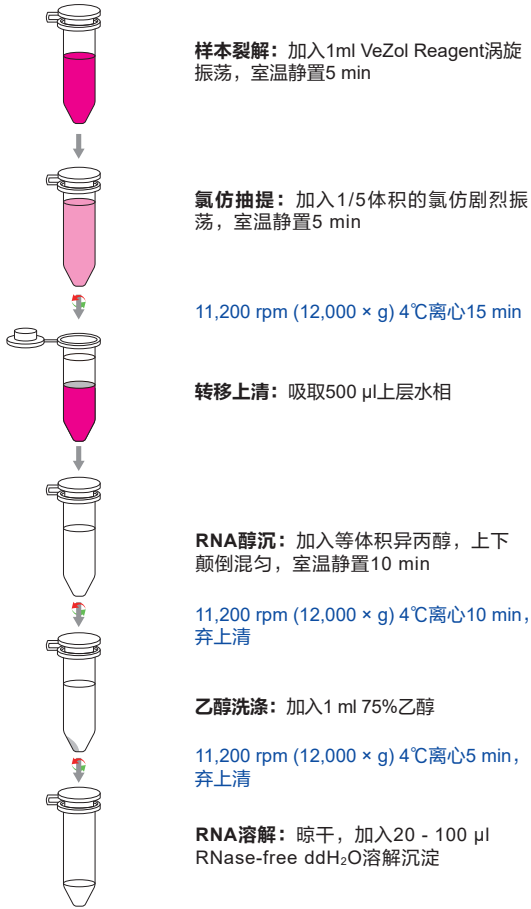


Fig 1. VeZol Reagent操作流程

08/实验流程

08-1/样本处理

1 ml VeZol Reagent能够充分裂解的最大样本量如下：

贴壁细胞	$1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ 个(直径3.5 cm皿, 约10 cm ²)
悬浮细胞	$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 个
动物组织	50 - 100 mg
植物组织	50 - 100 mg

▲ 过多的样本量可能会导致裂解不充分，并使产物纯度降低。

▲ 样本体积不应超过VeZol Reagent试剂体积的10%。

贴壁细胞

1. 弃去培养液，用1 × PBS清洗一次。
2. 常规6孔板每孔或直径3.5 cm平皿(约10 cm²培养面积)的细胞加入1 ml VeZol Reagent，使之充分覆盖到细胞表面，然后用移液器反复吹打细胞使其脱落。
▲ 对于贴壁牢固的细胞(细胞团)可采用细胞刮或者洁净的枪头剥离，也可在加入VeZol Reagent之前采用胰酶消化处理细胞，然后按照悬浮细胞进行操作。
3. 将裂解液转移至1.5 ml离心管中，用移液器反复吹打直至充分裂解，室温静置5 min。

悬浮细胞

1. 2,300 rpm (500 × g) 4℃离心2 - 5 min弃上清，收集细胞。
2. 每 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 个细胞加入1 ml VeZol Reagent。
3. 涡旋振荡或用移液器反复吹打直至充分裂解，室温静置5 min。
▲ 对于冻存细胞，加入VeZol Reagent应立即进行振荡，否则会导致裂解不充分。

动物/植物组织

◇液氮研磨

1. 取超低温冻存的组织或将新鲜组织用液氮速冻，再将样本迅速转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨，期间不断加入液氮，直至研磨成粉末状(无明显可见颗粒)。
▲ 研磨不彻底会影响RNA的得率和质量。
▲ 植物样本建议使用液氮研磨的方式。
2. 将研磨成粉的样本转移至离心管中，每50 - 100 mg组织中加入1 ml VeZol Reagent，涡旋振荡直至无明显团块，室温静置5 min。
3. (可选)若样本中脂肪含量高，可11,200 rpm (12,000 × g) 4℃离心5 min，去除上层油脂，然后将透明上清转移至新的RNase-free离心管中。

◇匀浆处理

1. 取新鲜组织，每50 - 100 mg组织中加入1 ml VeZol Reagent，用玻璃匀浆器、电动匀浆器等进行匀浆，直至无明显组织块，室温静置5 min。

- (可选)若样本中脂肪含量高,可11,200 rpm (12,000 × g) 4℃离心5 min, 去除上层油脂, 然后将透明上清转移至新的RNase-free离心管中。

08-2/总RNA提取

- 向上述裂解液中加入1/5体积的氯仿。剧烈振荡15 sec, 成乳浊液, 室温静置5 min。
 - ▲若样本含有丰富的基因组, 样本裂解后按1 ml VeZol Reagent加入5 μl冰醋酸混匀, 再加入氯仿进行抽提。
 - ▲此步必须混匀成均一乳浊状, 否则会影响离心分层。
- 11,200 rpm (12,000 × g) 4℃离心15 min。
 - ▲此步必须低温离心, 否则可能会导致基因组污染增加。
- 小心取出离心管。此时溶液分为三层: 上层水相(含RNA)、中间层和红色有机层。小心吸取上层水相(约500 μl)至新的RNase-free离心管中, 切勿吸到中间层。
 - ▲上层体积约占起始VeZol Reagent体积的60%, 如用1 ml VeZol Reagent提取, 上层水相约为600 μl。
- (可选)如果起始样本很少(<10⁶个细胞或<10 mg组织), 可向上层水相中加入5 - 10 μg RNase-free糖原(自备)。
- 加入等体积异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温静置10 min。
- 11,200 rpm (12,000 × g) 4℃离心10 min, 通常可看见白色沉淀, 小心弃去上清。
 - ▲RNA含量少的样本沉淀不明显, 继续按照流程操作即可。
 - ▲为减少杂质残留, 此步骤尽可能将上清弃干净, 去除上清后可将RNase-free管倒扣于干净的吸水纸上静置1 min, 请勿倒掉或吸走RNA沉淀。
- 加入1 ml 75%乙醇(RNase-free ddH₂O配制)。轻弹管底, 让沉淀悬浮起来, 并上下颠倒数次。
- 11,200 rpm (12,000 × g) 4℃离心5 min, 小心弃去上清。
 - ▲为减少杂质残留, 此步骤尽可能将上清弃干净, 勿丢失沉淀。建议弃去大部分上清后, 短暂离心将所有液体甩至管底, 再用移液器将剩余液体吸掉, 请勿倒掉或吸走RNA沉淀。
- 在洁净的环境中室温敞口干燥沉淀2 - 5 min, 加入20 - 100 μl RNase-free ddH₂O溶解沉淀, 室温涡旋或用移液器反复吹打, 使RNA沉淀充分溶解。提取产物分装后-85 ~ -65℃长期保存, -30 ~ -15℃短期保存。
 - ▲注意不可过分干燥, 否则会导致RNA难以溶解。
 - ▲可在55 ~ 60℃的水浴中孵育10 - 15 min促进RNA的溶解。

09/常见问题与解决方案

常见问题	原因	解决方案
RNA 得率低	1. 样本裂解或匀浆不彻底	减少样本投入量 将组织样本切成小块，充分研磨或匀浆，以确保完全裂解
	2. RNA沉淀未完全溶解	可在55 ~ 60℃的水浴中孵育10 - 15 min促进RNA沉淀的溶解
RNA 发生降解	1. 存在RNase污染	确保所有提取试剂和器具未被RNase污染，耐高温器具可于150℃烘烤4 - 6 h以去除RNase，其它器具可用0.1%的DEPC水浸泡过夜 做好防护工作，戴口罩和一次性干净手套，并在单独的洁净区操作
	2. 样本保存或处理不当	若不能立即提取，应将离体组织迅速投入液氮冷冻，并用液氮保存；或液氮速冻后，转移至-85 ~ -65℃保存。不要直接将组织放在-85 ~ -65℃冷冻，速冻过程缓慢，内源RNase可能会将RNA降解 针对不具备液氮速冻条件的情况，可将新鲜组织充分浸泡在RNA Keeper Tissue Stabilizer (Vazyme #R501)中，室温可存放一周，2 ~ 8℃存放一个月，-30 ~ -15℃(或-85 ~ -65℃)长期保存 样本取出后立即加入VeZol Reagent，并迅速进行后续操作，避免内源RNase降解RNA
	3. 样本内源RNase含量高	减少样本投入量 采用液氮研磨的处理方式，过程中样本始终保持超低温 使用2 ~ 8℃预冷的VeZol Reagent进行样本裂解
	4. RNA产物保存不当	取少量样本检测，其余分装后在-85 ~ -65℃保存。电泳检测可提高电压并缩短电泳时间(建议220 V, 10 min)，同时对电泳缓冲液冰浴降温，防止电泳过程中RNA发生降解
有基因组污染	1. 离心温度不当	加入氯仿后，需在低温(2 ~ 8℃)下高速离心
	2. 取水相操作不当	吸取水相需小心，可适当保留，切勿吸到中间层和下层，避免基因组污染
	3. 样本含有丰富的基因组	样本裂解后按1 ml VeZol Reagent加入5 μl冰醋酸混匀，进行后续操作
纯度低	1. 杂质、盐离子残留	增加75%乙醇(用RNase-free ddH ₂ O配制)洗涤沉淀的次数 步骤(08-2/总RNA提取步骤6、步骤8)中尽可能弃尽上清
加入异丙醇离心后看不见沉淀	1. RNA含量低或组织投入量过低	取上层水相，加5 - 10 μg RNase-free糖原作为载体与RNA共沉淀 加入异丙醇(08-2/总RNA提取步骤5)后，可2 ~ 8℃或-30 ~ -15℃放置10 - 30 min后离心，且在弃上清(08-2/总RNA提取步骤6、步骤8)时，请勿倒掉或吸走RNA沉淀。
	2. 样本中含较多的代谢产物	由于部分组织样本含较多代谢产物，导致沉淀不能聚集而分散在离心管壁上，此时，请沿液面缓慢吸取上清，防止倒掉或吸走RNA沉淀



Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.

Web: www.vazyme.com

Tel: +86-400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

