

Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation Reagent

货号	规格
E044-1	100 mL
E044-2	200 mL
E044-3	500 mL

产品简介

Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation Reagent 是一款从细胞, 组织及细菌中提取 RNA, DNA 以及蛋白质的即用型试剂。Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation 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。Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation 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, Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation Reagent 还可以用于 DNA 和蛋白质的提取。

保存条件

Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation Reagent 室温运输。收到试剂后于 2-8°C 保存。保质期为一年。

实验所需耗材（不包含在试剂中）

- 氯仿
- 100%乙醇
- 75%乙醇(DEPC 处理水配制)
- 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol
- 8 mM NaOH
- 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)

Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation Reagent 的用量与组织的关系

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

注: 样品的体积不能超过 Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation Reagent 体积的 10%。Glycogen 需另外购买, 使用时, 请用 DEPC 配制成 20 mg/mL。样品在 Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation 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

- 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 Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation 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 Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation 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 Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation 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 Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation 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 处理 10 分钟, 然后加入 1mL Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation Reagent, 涡旋 1 分钟。
 - 微量真菌: 转移 <50mg 真菌样品至 2ml 真菌/细菌匀浆管中, 加入 1mL Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation Reagent, 高速涡旋 5-10 分钟裂解真菌。
- 室温放置 3~5 分钟。
- (可选) 4°C, 12,000 x g 离心 10 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。
- 按 1mL Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation Reagent 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。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, 过多的氯仿会逼使 DNA 和蛋白质回到水相中, 导致 RNA 的纯度下降。若样品含有丰富的 DNA, 按 1mL Chemi-ExCo™ NucleoZol Plus Isolation Reagent 加入 5μl 冰醋酸混匀后, 再加入氯仿进行抽提。
- 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。
- 弃上清液(~500μL), 加入 300μL 100%乙醇到有机相和中间层, 颠倒或涡旋混匀, 室温静置 5 分钟。
- 4°C, 2,000 x g 离心 5 分钟沉淀 DNA, 倒弃上清液。
- 加入 1mL 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol。涡旋或颠倒混匀, 室温静置 30 分钟。
- 4°C, 2,000 x g 离心 5 分钟, 倒弃上清液。
- 重复步骤 8, 9 一次。
- 加入 1.5-2mL 75% ethanol。涡旋或颠倒混匀, 室温静置 10-20 分钟。
- 4°C, 2,000 x g 离心 5 分钟, 倒弃上清液,再空气干燥 5-10 分钟。
- 加入 0.3-0.6 mL 8 mM NaOH 涡旋重悬 DNA 沉淀。冰上放置 10-20 分钟让 DNA 充分溶解。
- 4°C, 12,000 x g 离心 10 分钟去除沉淀, 转移上清液到新的离心管。

下游分析

1. OD 测量

涡旋 DNA 样品，吸取 1-2 μ L DNA，用 10 mM Tris, pH 7.4 稀释 20-100 倍，于紫外分光光度计测量 260nm(核酸), 280nm(蛋白)的吸光值。

- DNA 浓度($\text{ng}/\mu\text{l}$)= $\text{OD}_{260} \times 50 \times$ 稀释倍数；
- DNA 的理想纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} \approx 1.8$ 。

2. 电泳分析

取~100 ng DNA 上样于 1.0%琼脂糖凝胶，5V/cm 电泳 15-30 分钟。

常见问题

1. 处理不同组织时，DNA 的产量如何？

组织类型	每 mg 样本 DNA 产量
肝脏、脾脏	5-7 μg
肾脏	3-4 μg
肌肉、脑组织	2-3 μg
胎盘	2-3 μg
肺组织	3-4 μg

2. 提取的 DNA 产量低或降解了？

- DNA 过于干燥，或 DNA 还没有完成溶解；
- 样品匀浆不够充分。

3. DNA 的污染

- 上清液转移不干净；
- Nuclezol 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。