

【产品概述】

BRizol™ 是基于异硫氰酸胍/酸性酚/氯仿的通用型总 RNA 提取试剂。该即用型提取试剂具有极强的裂解能力，可在短时间内裂解细胞或组织样本，释放 RNA 的同时快速失活各类核酸酶，以确保提取 RNA 的完整性。溶液经氯仿抽提后形成含 RNA 的无色上层水相、及含有 DNA 和蛋白质的中间相和红色下层有机相。通过异丙醇沉淀上层水相中的总 RNA 并进一步洗涤、溶解，即可以获得高纯度 RNA 用于 mRNA 分离、RT-PCR、RT-qPCR、Northern 杂交等各种应用。BRizol™ 适用于细胞、动物组织、微生物、植物等多种样本的总 RNA 提取；同时也可用于氯仿抽提后中间相和下层有机相中 DNA 和蛋白质的提取。

【产品组分】

组分	M1TR01-01
BRizol™ Universal Total RNA Isolation Reagent	100 mL

【运输与储存】

试剂常温运输，收到后 2~8℃避光保存；产品有效期 1 年。

【注意事项】

- BRizol™ 含有苯酚，具有一定的腐蚀性，使用时应穿戴防护用品，如实验服、手套、面罩、护目镜等。若不慎接触皮肤，请立即用大量水冲洗；如仍有不适，请尽快就医。
- 唾液、皮肤表面和实验环境常含有大量 RNase，实验操作建议在超净工作台等洁净区域进行，佩戴口罩并经常更换一次性手套。
- 使用 RNase-Free 的试剂（洗涤液、洗脱液）、器具（匀浆器、研钵等）和耗材（移液枪头、离心管等），避免因 RNase 污染导致的 RNA 降解。
- DEPC 处理水配制：超纯水中加入终浓度 0.1% 的 DEPC，室温震荡处理 2 小时以上，高压灭菌后使用。

【自备试剂】

氯仿、异丙醇、RNase-Free ddH₂O、75%乙醇（使用 RNase-Free ddH₂O 进行配制）。



【实验操作】

一、样本处理

- a) 贴壁细胞：弃除培养液，用 $1\times$ PBS 清洗一次，每 10 cm^2 培养面积细胞加入 1 mL BRlzol™，用细胞刮刀刮取，并用移液器吹打细胞裂解液至彻底混匀，转移到离心管中进行提取操作。
- b) 悬浮细胞： $1,000\sim 3,000\times g$ 离心 5 min ，弃培养液，收集细胞。每 $5\sim 10\times 10^6$ 个细胞加入 1 mL BRlzol™，使用移液器反复吹打裂解细胞。
- c) 动物或植物组织：将新鲜组织使用液氮速冻，然后迅速转移到液氮预冷的研钵中进行研磨，直至样品完全成细粉末状。研磨期间不断加入液氮，避免液氮挥发后样品解冻。使用液氮预冷的药匙将 $50\sim 100\text{ mg}$ 粉末转移到离心管中，加入 1 mL BRlzol™，待粉末融化后，使用移液器吹打至溶液澄清。
【可选】若无液氮研磨条件，可将组织剪碎后浸泡在 BRlzol™ 中，使用高效匀浆器匀浆，注意匀浆过程保持低温并尽量缩短匀浆时间。
- d) 可选步骤：若样品含有较多脂肪、蛋白、多糖、植物结节等，可在 4°C ， $12,000\times g$ 离心 10 min ，转移上清到新的离心管中进行提取操作。

二、总 RNA 提取

1. 将上述裂解液室温放置 5 min ，以完全解离核酸-蛋白复合物。
2. 向上述裂解液中加入 $1/5$ 体积的氯仿（每 1 mL BRlzol™ 加入 0.2 mL 氯仿），盖紧管盖，剧烈震荡 15 S 成乳浊液，室温静置 2 min 。
3. 4°C ， $12,000\times g$ 离心 15 min ，样品分为三层：上层无色水相，中间相和下层红色有机相，RNA 主要在上层水相中。
4. 小心转移上层水相至新的无核酶离心管中，应避免吸到中间层导致基因组污染。使用 1 mL BRlzol™ 进行提取时，一般上层水相约为 $500\text{ }\mu\text{L}$ ，建议吸取 $400\text{ }\mu\text{L}$ 进行下一步操作。
5. 在收集的上层水相溶液中加入等体积的异丙醇（如在 $400\text{ }\mu\text{L}$ 上清中加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ 异丙醇），上下颠倒混匀， 4°C 放置 10 min 。
6. 4°C ， $12,000\times g$ 离心 10 min ，通常可以观察到底部存在白色或半透明的 RNA 沉淀。
7. 小心弃上清，加入 1 mL 75% 的乙醇（使用 RNase-Free ddH₂O 配制），颠倒混匀数次洗涤 RNA。
8. 4°C ， $7,500\times g$ 离心 5 min ，弃上清。注意不要倒出沉淀，剩余少量液体短暂离心后用移液器吸出。
9. 在超净工作台等洁净环境中敞开管盖室温晾干 $5\sim 10\text{ min}$ 。防止过分干燥导致 RNA 难以溶解。
10. 加入适量的 RNase-Free ddH₂O，反复吹打充分溶解 RNA。提取产物可以直接用于各种下游应用，或置于 -80°C 保存备用。



三、产物检测

1. 产物纯度可以用分光光度计进行检测， OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8-2.2 之间表明 RNA 纯度较好。
2. 产物浓度可以采用分光光度计检测，RNA 浓度 ($ng/\mu L$) = $OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40$ ；也可用 Nanodrop 等仪器直接进行检测。
3. 产物完整性可以通过 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，电压 5 V/cm 电泳 25 min。若样本所属物种对应的 RNA 主条带清晰，无明显弥散或拖尾现象，说明产物完整性好。小鼠等动物样本 RNA 为 28S，18S 以及 5S 三条带，且 28S 条带亮度大约是 18S 条带亮度的两倍，说明产物完整性好。
4. 也可以通过毛细管电泳等方式检测 RNA 浓度及完整性。

【常见问题及解决方案】

问 题	可能原因	解决方案
RNA 低得率	异丙醇沉淀不够充分	延长沉淀时间或者放置在-20°C进行沉淀
	RNA 沉淀未能完全溶解	使用移液器反复吹打，或者使用 40°C预热的无 RNase 水溶解
	样品裂解或研磨/匀浆不彻底	对样品进行充分研磨/匀浆，确保裂解充分
DNA 污染	样品匀浆时加入 BRizol™ 太少	根据样品的添加量适当增加 BRizol™ 用量
	加入氯仿后的离心温度过高	保证离心时温度在 2~8°C范围
RNA 降解	组织离体后未马上进行处理或冷冻	组织离体后立即提取 RNA 或液氮速冻后保存在-80°C
	电泳时间太长，缓冲液多次使用	提高电泳电压，清洗电泳槽并更换新鲜电泳缓冲液
	溶液、耗材等存在 RNase 污染	玻璃制品可在 150°C烘烤 4h，塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10min，然后用水彻底清洗，再灭菌 溶液使用 DEPC 处理水等 RNase-Free ddH ₂ O 进行配制
	样品用量过多导致未能完全裂解	适当减少组织投入量，保证裂解完全
蛋白多糖污染	样品中蛋白多糖含量过高	选取蛋白多糖含量少的组织部位进行取样
	样品量过多	减少组织的投入量





**SERVE SCIENCE
SEE THE FUTURE**