

Code No. 9108/9109

研究用

TaKaRa

RNAiso Plus
(Total RNA 提取试剂)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● RNA 提取实验前的准备	1
● 实验操作	2
● RNA 提取操作流程图	3
● RNA 纯度分析	4
● Troubleshooting	4
● 参考文献	5
● 相关产品	5

● 制品说明

本制品可以从动物组织、植物材料、各种微生物、培养细胞等中提取 Total RNA。样品在 RNAiso Plus 中能够充分被裂解，在加入氯仿离心后，溶液会形成上清层、中间层和有机层（鲜红色下层，含有蛋白质、多糖、脂肪酸、细胞碎片和少量 DNA），RNA 分布在上清层中，收集上清层，注意不要收集中间层，经异丙醇沉淀便可以回收得到 Total RNA。使用 RNAiso Plus，Total RNA 的提取过程可在 1 小时内完成。提取的 Total RNA 纯度高，很少含蛋白质及基因组 DNA，可以直接用于 Northern 杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RT-PCR*等各种分子生物学实验。

*：如果用于 RT-PCR 实验，即使有少量的基因组 DNA 也会影响实验结果，因此，实验前应使用 Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A) 进行处理。

● 制品内容

RNAiso Plus(Code No. 9108)*	100 ml
RNAiso Plus (Code No. 9109) *	200 ml

* RNAiso Plus 中含有强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即到医院进行处理。

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆ 氯仿
- ◆ 异丙醇
- ◆ 75%乙醇 (RNase-free 水配制)
- ◆ RNase-free 水

● 保 存

4°C。

避光保存以保持活性。

● RNA 提取实验前的准备

- 1、尽量使用一次性塑料器皿。使用高温高压灭菌后的离心管或用于微量移液器的枪头。若使用玻璃器皿等，应进行 160°C 干热灭菌 2 小时。
不能进行干热灭菌的器皿，需用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37°C 下处理 12 小时，然后在高温高压灭菌以除去残留的 DEPC。
RNA 实验用的器具建议专门使用，不要用于其它实验。
- 2、使用的无菌水须用 0.1% 的 DEPC 处理后再进行高温高压灭菌。如果使用的试剂不能高温高压灭菌，请使用高压灭菌后的仪器盛装，无菌过滤后使用。
- 3、请使用一次性塑料手套和口罩进行所有试剂配制和实验操作，以避免 RNase 污染。

● 实验操作

1. RNAiso Plus 的使用量情况如下:

样品量	RNAiso Plus 使用量 (ml)
10 cm ² 的贴壁培养细胞	1-2
5 × 10 ⁶ -1 × 10 ⁷ 的非贴壁培养细胞	1
100 μl 的白细胞	2
50~100 mg 的组织样品 (易提取 RNA)	1
50~100 mg 的组织样品 (不易提取 RNA, 如肝、脾、骨及软骨* ¹ 等)	2
15~30 mg 的植物材料* ² (多糖和多酚含量不高的)	1
2~5 × 10 ⁷ 的酵母细胞* ³	1

*1: 从骨及软骨提取的 RNA 时, 可选择 High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (Code No. 9193)和 RNAiso Plus 配套使用

*2: 从含有大量多糖的植物样本提取时, 可选择 Fruit-mate™ for RNA Purification (Code No. 9192)和 RNAiso Plus 配套使用

*3: 从酵母中提取 RNA 时, 可选择 Yeast Processing Reagent (for total RNA preparation) (Code No. 9089)和 RNAiso Plus 配套使用

2. 实验样品的研磨和匀浆。

A. 贴壁培养细胞

① 倒出培养液, 用 1 × PBS 清洗一次。

② 每 10 cm²生长的培养细胞中加入 1-2 ml 的 RNAiso Plus, 轻微晃动, 确保使裂解液均匀分布于细胞表面。

NOTE: 对于贴壁牢固的培养细胞可用细胞刮勺剥离细胞。

③ 将内含细胞的裂解液转移至离心管中, 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。

④ 室温 (15-30°C) 静置 5 分钟, 然后从核蛋白中分离 RNA。

B. 悬浮培养细胞

① 将悬浮培养细胞连同培养液一起倒入离心管中, 8,000 × g 4°C 离心 2 分钟, 弃上清, 注意不要破坏细胞沉淀。

② 向每 5 × 10⁶ 个细胞中加入 1 ml 的 RNAiso Plus。

③ 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。

④ 室温 (15-30°C) 静置 5 分钟, 然后从核蛋白中分离 RNA。

C. 动物组织、植物材料样品

① 将超低温冻结的 RNA 提取样品称量后迅速转移至用液氮预冷的研钵中, 用研杵研磨组织, 其间不断加入液氮, 直至研磨成粉末状 (如果没有研磨彻底会影响 RNA 的收率和质量)。可以向研钵中加入与样品匀浆量匹配的适量的 RNAiso Plus。对于新鲜的组织样品, 立即加入 RNAiso Plus, 充分匀浆。

② 将匀浆液转移至离心管中, 室温 (15-30°C) 静置 5 分钟。

③ 12,000 × g 4°C 离心 5 分钟。

④ 小心吸取上清液, 移入新的离心管中 (切勿吸取沉淀)。

3. Total RNA 的提取。

① 向上述步骤 2 的匀浆裂解液中加入氯仿 (RNAiso Plus 的 1/5 体积量), 盖紧离心管盖, 混合至溶液乳化呈乳白色。

- ② 室温静置 5 分钟。
- ③ $12,000 \times g$ 4°C 离心 15 分钟。从离心机中取出离心管，此时匀浆液分为三层，即：无色的上清液（含 RNA）、中间白色蛋白层（大部分为 DNA）及带有颜色的下层有机相。
- ④ 吸取上清液转移至另一新的离心管中（切勿吸出白色中间层）。
- ⑤ 向上清中加入 0.5–1 倍 RNAiso Plus 体积的异丙醇，上下颠倒离心管充分混匀后，室温下静置 10 分钟。
- ⑥ $12,000 \times g$ 4°C 离心 10 分钟。一般在离心后，试管底部会出现 RNA 沉淀。

4. RNA 沉淀的清洗。

小心弃去上清，切勿触及沉淀，残留少量异丙醇没有关系。加入与 RNAiso Plus 等量的 75%乙醇，轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁， $7,500 \times g$ 4°C 离心 5 分钟后小心弃去上清，切勿触及沉淀。

5. RNA 的溶解。

打开离心管盖，室温干燥沉淀几分钟。沉淀干燥后，加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀。

NOTE：不可以离心或加热干燥，否则 RNA 将会很难溶解。

● RNA 提取操作流程简图



*：组织样品必需步骤

● RNA 纯度分析

1. 用琼脂糖凝胶电泳（1%琼脂糖+溴乙锭）分析

电泳用于分析按以上方法提取获得的 1-2 μg 热变性 total RNA。对于没有降解的 RNA 可能是 2 种核糖体 RNA（真核细胞：28S 和 18S），条带亮度约为 2:1。但如果核糖体 RNA 条带弥散，说明可能 RNA 已降解。此外，如果条带大小超过 28S，可能存在基因组 DNA 污染，建议使用 DNase I 处理。

2. 吸光度分析

用 TE Buffer 稀释 RNA 后测定吸光度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.7-2.1 为好。

例：

RNA 浓度计算方法：

RNA 浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = (OD₂₆₀-OD₃₂₀) \times 稀释倍数 \times 0.04

● Troubleshooting

1. 一般情况下的组织或细胞中所能提取的 RNA 量如下表：

组织材料	起始样品量	Total RNA提取量
全血*	1 ml	15~20 μg
白细胞	1×10^7 个	约20~40 μg
小鼠肝脏	1 g	约4,000~5,000 μg
HL-60培养细胞	1×10^7 个	约100 μg
烟草叶片	1 g	约1,000 μg
小鼠肾脏	1 g	约3,000 μg
小鼠骨骼肌	1 g	约1,500 μg
小鼠脑	1 g	约1,500 μg
鲤鱼骨骼肌	1 g	约50 μg

*: 100 μl 全血使用 1 ml RNAiso Plus

如果收量少于预期，可能由于以下原因：

- 1、加入 RNAiso 后研磨不充分
- 2、三相分层时，上清液取量过少
- 3、RNA 沉淀没有完全溶解
- 4、在异丙醇沉淀或清洗步骤存在 RNase 污染

2. OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值 < 1.65，为什么？

- ① RNA 应使用 TE Buffer 稀释后再进行吸光度值的测定，低离子强度或低 pH 值会使 OD₂₈₀ 值升高。
- ② 样品裂解时加入的 RNAiso Plus 量偏少，造成蛋白分离不充分，可以再次对 RNA 溶液进行处理，以除去蛋白。
- ③ 含有裂解液的样品经匀浆混匀后未在室温静置，或静置的时间不足 5 分钟。这一步是从核酸中分离核蛋白的重要步骤。
- ④ 相分离后，吸取上清液时不小心接触蛋白层造成污染。
- ⑤ RNA 未充分溶解。

3. 提取的 RNA 不溶怎么办？

- ① 若 75%乙醇清洗沉淀后干燥时间过长，则 RNA 沉淀会难以溶解。避免加热或离心干燥沉淀。
- ② 可以于 60°C 加热 5 分钟后再于冰上溶解数小时可有助于沉淀溶解。

4. 提取的 RNA 降解，为什么？
- ① 使用的组织材料不够新鲜。提取 RNA 的组织材料应采用新鲜的组织材料，或将新鲜的组织材料用液氮迅速冷冻后置于-80℃保存。
 - ② 提取 RNA 时使用的试剂及器材中混有 RNA 分解酶。
 - ③ 提取的组织材料中含有大量的 RNA 分解酶，而 RNAiso Plus 的添加量不够。
5. 提取的 RNA 中含有 DNA 污染，为什么？
- ① 裂解组织或细胞使用的 RNAiso Plus 量偏少。请按用量表添加或多于用量表添加。
 - ② 使用的组织材料中含有大量的有机溶剂（如：乙醇、异丙醇等）、高浓度的 Buffer、碱性溶剂等。
 - ③ 如果提取的 RNA 中含有 DNA 时，可以使用 Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A) 进行 DNA 消化。
6. 提取的 RNA 中含有多糖怎么办？
- 大多数的植物及动物肌肉组织中都含有大量多糖，因此很难将其从 RNA 中除去，使用此类组织材料提取 RNA 时，建议增加 RNAiso Plus 的使用量。
- 对于从含有大量多糖的植物样本中提取 RNA 时，推荐使用 Fruit-mate for RNA Purification (Code No. 9192)作为预处理试剂。在异丙醇沉淀纯化步骤中加入 High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (Code No. 9193)可有效除去 RNA 溶液中的多糖。

● 参考文献

- 1) Chirgwin J, *et al* . Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease. *Biochemistry*. (1979)**18**(24): 5294-5299.
- 2) Wallace D. Large-and Small-Scale Phenol Extractions. *Methods in Enzymology*.(1987)**152**:33-41.
- 3) Coombs L M, Pigott D, Proctor A, Eydmann M, Denner J, and Knowles M A. Simultaneous Isolation of DNA, RNA, and Antigenic Protein Exhibiting Kinase Activity from Small Tumor Samples Using Guanidine Isothiocyanate. *Anal Biochem*. (1990)**188**: 338-343.
- 4) Nicolaides N C and Stoeckert C J Jr. A Simple, Efficient Method for the Separate Isolation of RNA and DNA from the Same Cells. *Biotechniques*. (1990)**8**: 154-156.
- 5) Feramisco J R, *et al* . *Molecular Cloning*: 194-195, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 6) Raha S, Merante F, Proteau G, and Reed J K. Simultaneous Isolation of Total Cellular RNA and DNA from Tissue Culture Cells Using Phenol and Lithium Chloride. *Gene Anal Techn*. (1990)**7**: 173-177.

● 相关产品

- High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (Code No. 9193)
- Fruit-mate™ for RNA Purification (Code No. 9192)
- Yeast Processing Reagent (for total RNA preparation) (Code No. 9089)
- Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A)

Fruit-mate is a trademark of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>