

Code No. 9112Q

研究用

TaKaRa

RNAiso Blood

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
● 实验例	2
● RNA 提取操作流程图	3
● RNA 纯度分析	3
● Troubleshooting	4
● 参考文献	5
● 相关产品	5

● 制品说明

本制品是一种从人或动物的血液及含水量较高的植物中可简单、快速分离 RNA 的 Total RNA 提取试剂。细胞在 RNAiso Blood 中裂解后，再加入氯仿充分混合后离心。离心后溶液会形成透明上清层、中间层和底层有机层。RNA 分布在上清层中，DNA 分布在中间层，暗红色下层含有蛋白质、多糖、脂肪酸、细胞碎片及少量 DNA。收集上清层，经异丙醇沉淀便可以回收得到 Total RNA。

使用本制品提取 Total RNA，全过程仅需 1 小时。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 RT-PCR*、Northern 杂交、mRNA 纯化、体外翻译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。或者进行 Real Time RT-PCR 时，请使用反转录试剂 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047A)。

注意：RNAiso Blood 适用于从含水量较高的样品（例如：血液、植物破碎液）中提取 Total RNA。从固体样品中提取 Total RNA 时，因 RNAiso Blood 中含有高浓度变性剂，会降低 RNA 收量。从固体样品中提取 RNA 时，请使用 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)。

● 制品内容

RNAiso Blood*	25 ml
---------------	-------

* RNAiso Blood 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，请立即用水冲洗后到医院进行处理。

【试剂盒之外所需试剂】

◆ 氯仿

◆ 异丙醇

◆ 75%乙醇（DEPC 处理水配制）

◆ RNase-free 水（制备方法：使用 RNase-free 的玻璃瓶，向超纯水中加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v)，过夜搅拌后，高温高压灭菌。）

● 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，微量离心管及枪头经高压灭菌后再使用；若使用玻璃器皿，应在使用前在 160°C 下干热灭菌 2 小时以上；不能干热灭菌的器皿用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37°C 下处理 12 小时，然后在 120°C 下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。RNA 实验用的器具建议专门使用，不要用于其它实验。
- 2、使用试剂须用 0.1%DEPC 处理的灭菌水配制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，请使用高温高压灭菌后的容器盛装，过滤灭菌后再使用。
- 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。

● 实验例

1. RNAiso Blood 的使用量如下:

样品使用量*1	RNAiso Blood 使用量
0.01*2~ 0.25 ml 液体样品 (血液、体液、果实破碎液)	液体样品量的 3 倍 (例如:样品为 0.25 ml 体液时, RNAiso Blood 的添加量为 0.75ml)

*1: 从含有大量多糖的植物样品提取 RNA 时, 请使用 Fruit-mate™ for RNA Purification (Code No. 9192) 进行前处理。

*2: 从微量样品中提取 RNA, 异丙醇沉淀时请使用 Dr. GenTLE™ Precipitation Carrier (Code No. 9094)。

2. 样品的研磨和匀浆

A. 血液样品

- ① 从生物体采取的血液中加入抗凝剂混合后, 当天提取 RNA 时 4℃ 保存, 当天不提取 RNA 时 -80℃ 保存。
- ② 将 0.25 ml 液体、血液样品或冷冻血液样品移至离心管中, 添加 0.75 ml RNAiso Blood。
- ③ 用移液枪上下反复吸打直至细胞完全裂解。(因基因组 DNA 有粘性, 不建议使用 Vortex 裂解细胞)

B. 血液以外的生物体液样品

- ① 采集样品后, 当天提取 RNA 时 4℃ 保存, 当天不提取 RNA 时 -80℃ 保存。
- ② 将 0.25 ml 液体样品或冻结样品移至离心管中, 添加 0.75 ml RNAiso Blood。
- ③ 用移液枪反复吸打直至细胞完全裂解。(因基因组 DNA 有粘性, 不建议使用 Vortex 裂解细胞)

C. 含水量较高的植物组织样品

- ① 将新鲜或冻结的植物组织迅速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 的收量和质量)。再加入 3 倍样品量的 RNAiso Blood, 充分匀浆。

(注 1): 含水量较少的组织样品, 在样品中添加 RNA-free water 稀释至 0.25 ml, 再加入 RNAiso Blood 提取 RNA。

(注 2): 含有大量多糖的植物样品使用 Fruit-mate for RNA Purification 进行前处理时, 按照说明书在处理后的 0.5 ml 样品中添加 0.5 ml RNAiso Blood。

- ② 将匀浆后的样品移至离心管中, 室温 (15-30℃) 静置 5 分钟。

3. Total RNA 的提取。

- ① 向上述步骤 2 的匀浆裂解液中加入氯仿 (样品液+RNAiso Blood 体积量的 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 × g、4℃ 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层。
- ④ 吸取上清液移至新的离心管中 (切勿吸出白色中间层)。
- ⑤ 向上清液中加入等量体积的异丙醇, 上下颠倒离心管充分混匀后, 室温下静置 10 分钟。
- ⑥ 12,000 × g、4℃ 离心 10 分钟, 试管底部会出现 RNA 沉淀。

4. RNA 沉淀的清洗。

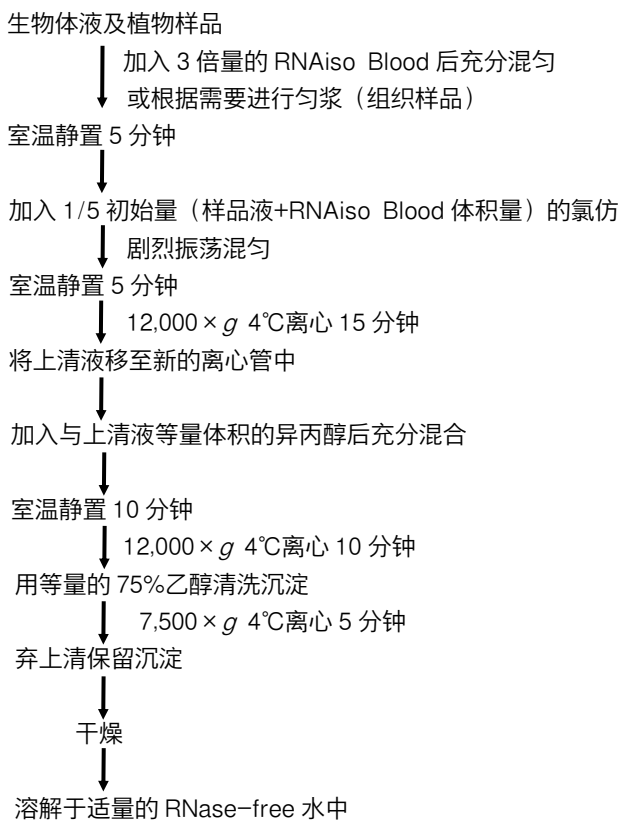
弃上清, 加入等量的 75% 乙醇, 使用 Vortex 轻微振荡清洗沉淀后, 7,500 × g、4℃ 离心 5 分钟, 弃上清。

5. RNA 的溶解。

室温干燥沉淀。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



● RNA 纯度分析

1. 琼脂糖凝胶电泳分析

将 0.2~1 μg 热变性处理后的 Total RNA 在 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行溴乙锭染色。没有降解的 Total RNA 显示为 2 种核糖体 RNA (真核细胞: 28S 和 18S, 原核细胞: 23S 和 16S), 条带亮度约为 2:1。但如果核糖体 RNA 条带弥散, 说明 RNA 可能已降解。此外, 如果条带大小超过 28S 或 23S, 可能存在基因组 DNA 污染, 建议使用 DNase I 处理。

RNA 纯度分析可利用安捷伦 2100 生物分析仪进行正确分析。

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 范围内为好。

例: RNA 浓度计算方法:

$$\text{RNA 浓度} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times \text{稀释倍数} \times 0.04$$

● Troubleshooting

1. RNA 收量少

RNA 收量因样品不同而不同。利用 RNAiso Blood 从 0.25 ml 液体样品或 50 mg 含水量较高的植物中所能提取的 RNA 量如下表：

样品	样品量	Total RNA 提取量
人全血	0.25 ml	1~10 μ g
小鼠全血	0.25 ml	1~10 μ g
牛全血	0.25 ml	1~10 μ g
鲤鱼全血	0.25 ml	10~100 μ g
菠菜叶片	50 mg	30~60 μ g
西红柿果实	50 mg	1~10 μ g
橘子	50 mg	1~10 μ g

如果收量少于预期，可能由于以下原因：

- 加入 RNAiso Blood 后匀浆不充分；
- 三相分层时，上清液取量过少；
- RNA 沉淀没有完全溶解；
- 在异丙醇沉淀或清洗时存在 RNase 污染；
- 在异丙醇沉淀或清洗时 RNA 沉淀流失；
 - 异丙醇沉淀时建议使用 Dr. GenTLE Precipitation Carrier(Code No. 9094)
- 水分含量少的组织样品，没有经过稀释直接使用 RNAiso Blood 进行了 RNA 提取。
 - 水分含量少的组织样品，添加 RNA-free 水使样品体积至 0.25ml，再加入 RNAiso Blood 进行 RNA 提取。

2. OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值 < 1.65

- 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。
- 样品加入 RNAiso Blood 经匀浆后，在室温静置 5 分钟，这一步是从核酸中分离核蛋白的重要步骤。
- 吸取上清液时，注意枪头不要接触中间蛋白质层。
- 提取的 RNA 未充分溶解。

3. 提取的 RNA 不溶解

- 若 75%乙醇清洗沉淀后干燥时间过长，则 RNA 沉淀会难以溶解。避免加热或长时间干燥沉淀。
- 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 已降解

- RNA 提取用样品，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°C 保存。
- 提取 RNA 时使用的样品及器皿中混有 RNA 分解酶。

5. 提取的 RNA 中有 DNA 污染

- 使用的样品中含有大量的有机溶剂（如：乙醇、异丙醇等）、高浓度的缓冲液、碱性溶剂等。
- 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?

对于从含有大量多糖的植物样本中提取 RNA 时, 建议使用 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**: 5294–5299.
- 2) Wallace D. Large-and Small-Scale Phenol Extractions. *Methods in Enzymology* . (1987) **152**: 33–41.
- 3) Coombs L M, *et al.* 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 Jr C J. 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, N. Y.
- 6) Raha S, *et al* . 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

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

Dr. GenTLE™ Precipitation Carrier (Code No. 9094)

Fruit-mate™ for RNA Purification (Code No. 9192)

High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (Code No. 9193)

Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A/B)

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047A/B)

Dr. GenTLE, Fruit-mate, and PrimeScript are trademarks 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.takarabio.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: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202009Da