

Code No. 9753Q

研究用

TaKaRa

RNAiso for Small RNA

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存和运输	1
● RNA 提取实验前的准备	1
● 实验操作	2
● Small RNA 提取操作流程简图	3
● 实验例	4
● Troubleshooting	4
● 参考文献	5

注 意 事 项

本制品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会中毒、导致灼伤以及其他身体伤害。使用本制品时应穿戴防护物品，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不小心接触到眼睛时，应立即用大量的水冲洗以及前往医院治疗；接触到皮肤时，应立即用大量的聚乙二醇 400 (Polyethylene glycol 400) 冲洗，严重时请前往医院治疗；使用本制品后感觉不舒服时请前往医院治疗。



有毒物质



有腐蚀性

● 制品说明

RNAiso for Small RNA 是广谱型 Small RNA 提取试剂。实验操作快速方便，颜色鲜明，便于分层。本制品可以从动物组织、植物材料、各种微生物、培养细胞等中直接提取 Small RNA (20–200 nt)：包括 tRNA、5S rRNA、5.8S rRNA、microRNA (miRNA) 和 siRNA。样品在 RNAiso for Small RNA 中能够被充分裂解，在加入氯仿离心后，溶液会形成上清层、中间层和有机层（下层），只有 Small RNA 分布在上清层中，收集上清层后，经异丙醇沉淀便可以回收得到 Small RNA。

RNAiso for Small RNA 具有以下特性：

1. 广谱性强。可以从动物组织、植物材料、各种微生物、培养细胞等中提取 Small RNA。
2. 纯度俱佳。经本制品提取的 Small RNA 纯度高，可以除去大部分 28S 和 18S 大片段 RNA、蛋白质及基因组 DNA。提取的 Small RNA 适用于 Northern blot analysis、Quantitative、Real Time RT-PCR、Microarray analysis 等分子生物学实验。
3. 快速简便。实验操作快速方便，整个操作在一小时内便可完成。
4. 颜色鲜明。加入氯仿离心后，会形成无色的上清层和鲜红色的下层（有机层）。

● 制品内容

RNAiso for Small RNA*	25 ml
-----------------------	-------

* 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（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。）

● 保存和运输

1. 可以在室温下保存，建议在 2–8℃ 下避光保存，效果更佳。
2. 可以在常温下运输。

● RNA 提取实验前的准备

RNA 制备的关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用 RNA 操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

【使用器具】

尽量使用一次性塑料器皿，若用玻璃器皿，应在使用前按下列方法进行处理。

- （1）用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37℃ 下处理 12 小时。
- （2）然后在 120℃ 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，不要用于其他实验。

【试剂配制】

用于 RNA 实验的试剂，须使用干热灭菌（180℃，60 分钟）或使用上述方法进行 DEPC 水处理灭菌后的玻璃容器盛装（也可以使用 RNA 实验用的一次性塑料容器），使用的无菌水须用 0.1% 的 DEPC 处理后再进行高温高压灭菌。

RNA 实验用的试剂和无菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

● 实验操作

1. RNAiso for Small RNA 的使用量情况如下。

样品量	RNAiso for Small RNA 使用量 (ml)
10 cm ² 的贴壁培养细胞	1
10 ⁷ 的悬浮培养细胞	1-2
100 μl 的白细胞	2
50~100 mg 的普通组织样品	1
50~100 mg 的特殊组织样品 (肝、脾、骨及软骨等)	2
15~30 mg 的植物材料 (多糖和多酚含量不高的)	1

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 ml 的 RNAiso for Small RNA，水平放置片刻，使裂解液均匀分布于细胞表面并裂解细胞，然后使用移液枪吹打细胞使其脱落（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 室温静置 5 分钟。

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℃离心 2 分钟，弃上清。
- ② 向每 10⁷ 个细胞中加入 1-2 ml 的 RNAiso for Small RNA。
- ③ 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。
- ④ 室温静置 5 分钟。

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（无明显的可见颗粒，如果没有研磨彻底会影响 RNA 的收率和质量）。
- ② 对于普通的 RNA 提取样品，可以向研钵中加入适量的 RNAiso for Small RNA，将研磨成粉末状的样品完全覆盖，然后室温静置，直至样品完全融化，再用研杵继续研磨至裂解液呈透明状。对于特殊样品，如肝、脾、骨及软骨等，可以将研磨成粉末状的样品加入到含有适量的 RNAiso for Small RNA 的匀浆管中，把匀浆管置于冰浴中进行匀浆，直至匀浆液呈无颗粒透明状。
- ③ 将匀浆液转移至离心管中，室温静置 5 分钟。
- ④ 12,000 g 4℃离心 5 分钟。
- ⑤ 小心吸取上清液，移入新的离心管中（切勿吸取沉淀）。

3. Small RNA 的提取。

- ① 向上述步骤 2 的匀浆裂解液中加入氯仿（RNAiso for Small RNA 的 1/5 体积量），盖紧离心管盖，用手剧烈振荡 15 秒（氯仿沸点低、易挥发，振荡时应小心离心管盖突然弹开）。待溶液充分乳化（无分相现象）后，再室温静置 5 分钟。
- ② 12,000 g 4℃离心 15 分钟。
- ③ 从离心机中小心取出离心管，此时匀浆液分为三层，即：无色的上清液、中间白色蛋白层及带有颜色的下层有机相。吸取上清液转移至另一新的离心管中（切忌吸出白色中间层）。
- ④ 向上清液中加入等体积的异丙醇，上下颠倒离心管充分混匀后，在 15~30℃下静置 10 分钟。
- ⑤ 12,000 g 4℃离心 10 分钟。一般在离心后，试管底部会出现沉淀。

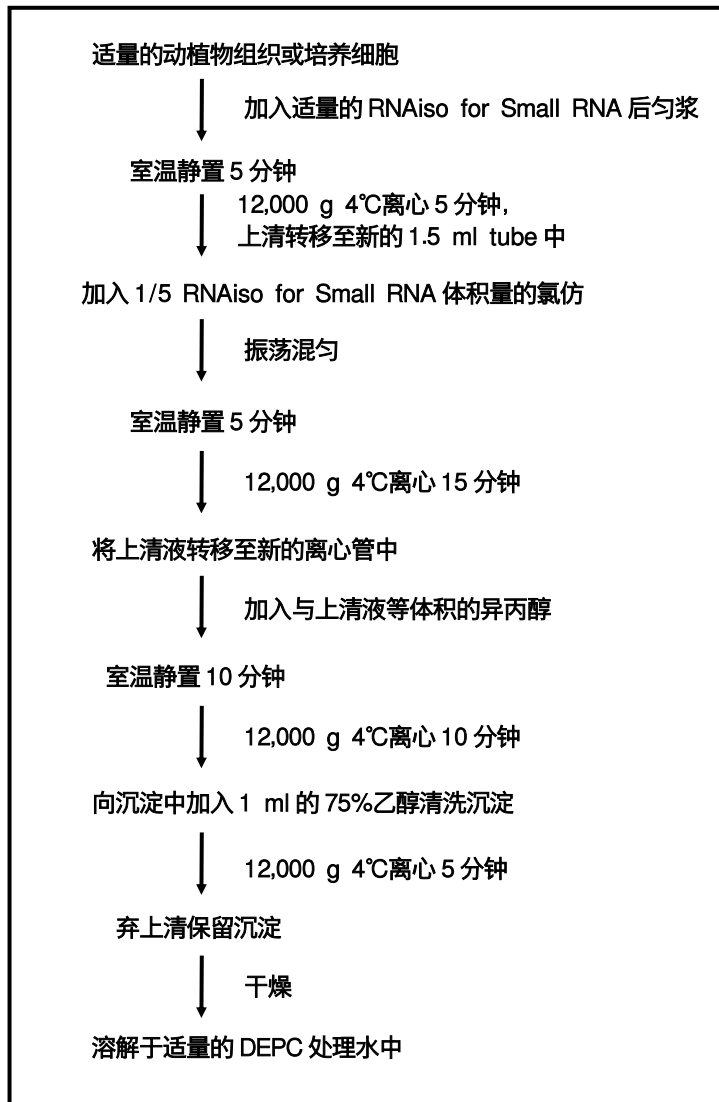
4. Small RNA 沉淀的清洗。

小心弃去上清，缓慢地沿离心管壁加入 75%的乙醇 1 ml（切勿触及沉淀），轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁，12,000 g 4℃离心 5 分钟后小心弃去乙醇（为了更好地控制 RNA 中的盐离子含量，应尽量除净乙醇）。

5. Small RNA 的溶解。

室温干燥沉淀 2~5 分钟（不可以离心或加热干燥，否则 RNA 将会很难溶解，有关 RNA 溶解可以参考 Troubleshooting 中的相关说明），加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀，必要时可用移液枪轻轻吹打沉淀，待 RNA 沉淀完全溶解后于-80℃保存。

● Small RNA 提取操作流程简图



● 实验例

1. 从动物组织中提取 Small RNA。

使用 RNAiso Plus (Code No. 9108)和本试剂从小鼠肝脏、大鼠骨骼肌中分别提取了 Total RNA 和 Small RNA，电泳结果见图 1。

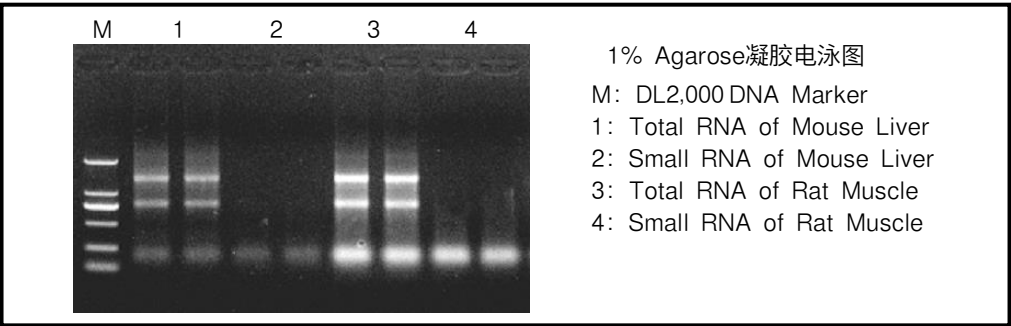


图 1. 动物组织 RNA 提取结果电泳图

2. 从 HL-60 Cell 中提取 Small RNA。

使用 RNAiso Plus(Code No. 9108)和本试剂从 HL-60 Cell 中分别提取了 Total RNA 和 Small RNA，电泳结果见图 2。

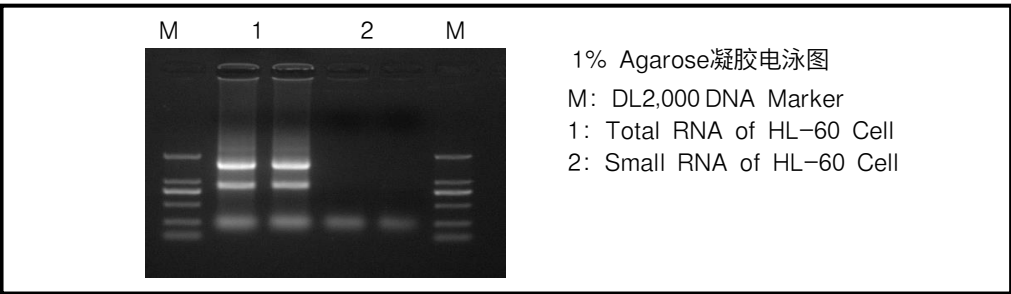


图2. HL-60 Cell RNA提取结果电泳图

● Troubleshooting

1. 一般情况下组织或细胞中所能提取的 Small RNA 量如下表 (表中所指提取量指提取得到的 Small RNA fragments 进行 OD 定量的结果，其提取量并不代表 miRNA 含量，且不同组织来源的 Small RNA 含量差别较大)：

组织材料	起始样品量	Small RNA提取量
肝脏	100 mg	约50 μ g
HL-60培养细胞	1×10^7 个	约15 μ g
骨骼肌	100 mg	约15 μ g

2. 有关 RNA 的吸光度说明如下：

260 nm、320 nm、230 nm、280 nm 下的吸光度分别代表了核酸、背景（溶液浑浊度）、盐浓度和蛋白质等有机物的吸光度值。OD₂₆₀/OD₂₈₀ (R) 体现了 RNA 中的蛋白质等有机物的污染程度，质量较好的 RNA 的 R 值应在 1.8~2.2 之间，当 R<1.8 时，溶液中的蛋白质等有机物的污染比较明显；当 R> 2.2 时，说明 RNA 已经被水解成了单核苷酸。

在对核酸进行吸光度检测时，需要注意稀释液应使用 TE Buffer。

3. 如何计算 RNA 的浓度?
RNA 浓度 = (OD₂₆₀ - OD₃₂₀) × 稀释倍数 × 0.04 μg/μl。
4. Small RNA 提取量较低怎么办?
 - ① 向组织材料中加入 RNAiso for Small RNA 后, 请充分研磨匀浆使其充分裂解。
 - ② 相分离后请尽量完全回收上清液。
 - ③ 增加起始组织加量, 并按比例添加 RNAiso for Small RNA。
5. 提取的 Small RNA 不溶怎么办?
 - ① 75%乙醇清洗沉淀后不要干燥时间过长或加热干燥。
 - ② 可以于 60℃加热 5 分钟后于冰上溶解数小时。
 - ③ RNA 沉淀中含有不溶的蛋白质混合物时, 应注意在相分离后吸取上清液时, 避免枪头接触蛋白层。
 - ④ 溶解液更换为 0.5%的 SDS 溶液 (DEPC 处理水配制)。
6. 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 for Small RNA 量偏少, 造成蛋白质变性不充分, 可以再次对 Small RNA 溶液进行苯酚/氯仿抽提, 以除去蛋白质。
 - 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。
 - 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。
7. 提取的 RNAiso for Small 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 for Small RNA 的添加量不够。
8. 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 for Small RNA 量偏少。
 - 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。

● 参考文献

1. J. Chirgwin, *et al.* "Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease", *Biochemistry*.18(24): 5294-5299 (1979).
2. D. Wallace, "Large-and Small-Scale Phenol Extractions", *Methods in Enzymology*.152: 33-41 (1987).
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.*188: 338-343 (1990).
4. Nicolaides, N. C. & Stoeckert, Jr., C. J. "A Simple, Efficient Method for the Separate Isolation of RNA and DNA from the Same Cells", *Biotechniques*. 8: 154-156 (1990).
5. J. R. Feramisco, *et al.* *Molecular Cloning*: 194-195, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
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.* 7: 173-177 (1990).

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。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

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