

Code No. TCH020/TCH021/TCH022

研究用

TaKaRa

RNAiso Easy
(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	3
● 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 Easy 中能够充分被裂解，在加入 Solution H 离心后，溶液会形成上清层、沉淀层（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，注意不要收集下层沉淀，经异丙醇沉淀便可以回收得到 Total RNA。使用 RNAiso Easy，Total RNA 的提取过程可在 1 小时内完成。提取的 Total RNA 纯度高，基本不含蛋白质及基因组 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

	TCH020	TCH021	TCH022
Solution H	40 ml	80 ml	10 ml
RNAiso Easy*	100 ml	200 ml	25 ml

* RNAiso Easy 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】

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

● 保 存

4℃。

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℃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℃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. 实验样品的研磨和匀浆。

A. 贴壁培养细胞

- ① 倒出培养液，用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗一次。
- ② 每 10 cm^2 生长的培养细胞中加入 1–2 ml 的 RNAiso Easy，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（ $15\text{--}30^\circ\text{C}$ ）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， $8,000 \times g$ 4°C 离心 2 分钟，弃上清，注意不要破坏细胞沉淀。
- ② 向每 5×10^6 个细胞中加入 0.5 ml 的 RNAiso Easy。
- ③ 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。
- ④ 室温（ $15\text{--}30^\circ\text{C}$ ）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）。向研钵中加入与样品匀浆量匹配的适量的 RNAiso Easy：大约每 50 mg 动物组织或 30 mg 植物组织加入 0.5 ml 的 RNAiso Easy。对于新鲜的组织样品，建议立即加入 RNAiso Easy，充分匀浆。
- ② 将匀浆液转移至离心管中，室温（ $15\text{--}30^\circ\text{C}$ ）静置 5 分钟。

2. Total RNA 的提取。

- ① 向上述步骤 1 的匀浆裂解液中加入 Solution H (RNAiso Easy 的 $2/5$ 体积量，如使用 0.5 ml RNAiso Easy 裂解样品，此时加入 0.2 ml 的 Solution H)，盖紧离心管盖，上下颠倒混合均匀。
- ② 室温静置 5 分钟。
- ③ $12,000 \times g$ 室温离心 15 分钟。从离心机中小心取出离心管，此时匀浆液分为 2 层，即：上清液（含 RNA）、沉淀层（大部分为 DNA 和蛋白质）。
- ④ 小心吸取 RNAiso Easy 等体积上清液转移至另一新的离心管中（切勿吸出沉淀）。（例如使用 0.5 ml RNAiso Easy 裂解样品，此时建议吸取 0.5 ml 上清液；如果预期样品中 RNA 含量较少，此时建议尽可能多的吸取上清，但可能会导致 RNA 纯度降低。）
- ⑤ 向上清中加入上清液等体积的异丙醇，上下颠倒离心管充分混匀后，室温下静置 10 分钟。
- ⑥ $12,000 \times g$ 室温离心 10 分钟。一般在离心后，试管底部会出现 RNA 沉淀。（有时样品中 RNA 含量较少，此步骤可能看不见明显沉淀，建议继续后续操作）

3. 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 1 ml 的 75%乙醇，轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁， $8,000 \times g$ 室温离心 3 分钟后小心弃去上清，切勿触及沉淀。

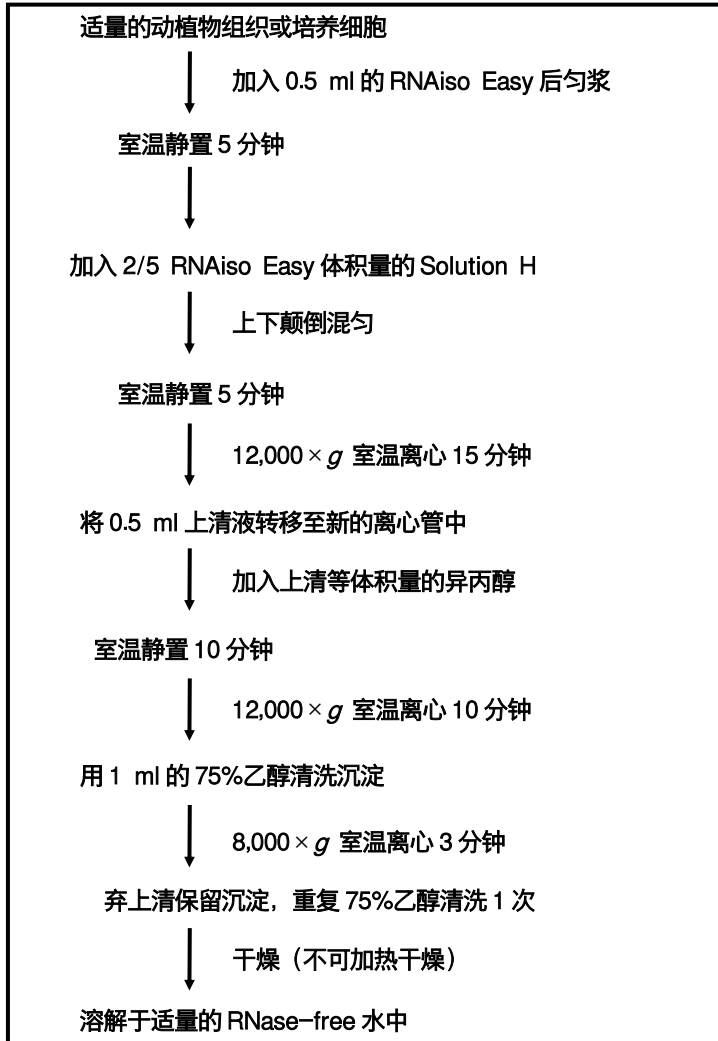
4. 重复步骤 3 一次（为减少杂质残留，建议应尽可能地将上清弃净，可以弃去大部分上清后，短暂离心将残留液体离心至管底，再用移液器将剩余液体吸掉）。

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 (以使用 0.5 ml RNAiso Easy 裂解样品为例)



● 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, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值在 1.7-2.1 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. 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
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
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
向日葵幼苗叶片	1 g	约1,500 μg
穿心莲叶片	1 g	约350 μg
玉米叶片	1 g	约600 μg

如果收量少于预期, 可能由于以下原因:

- ① 加入 RNAiso Easy 后研磨不充分
- ② 加入 Solution H 离心后, 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 Easy 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 加入 Solution H 离心后, 吸取上清液时不小心接触沉淀层造成污染。
- 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°C 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 Easy 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 Easy 量偏少。请按实验操作步骤 1. 建议的样品与 RNAiso Easy 比例添加或适当增加 RNAiso Easy 用量。
- 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, 推荐使用 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109), 配套使用 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

Recombinant DNase I (RNase–free) (Code No. 2270A)

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

Fruit–mate® for RNA Purification (Code No. 9192)

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

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.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。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司制作，最新版本文件请参考 Takara Bio（中国）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>