

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	4
● Troubleshooting	4
● 参考文献	5
● 相关产品	5

● 制品说明

本产品可以从动物组织、植物材料、各种微生物、培养细胞等样品中提取 Total RNA，且具有提取过程无需氯仿等有机试剂、提取全程可在室温下操作等优点，为不能使用氯仿且不具备低温操作条件的使用者提供了更为便利的选择（注意：本产品不适用于液体样品的 RNA 提取）。样品在 RNAiso Easy 中能够充分被裂解，在加入 Solution H 离心后，会形成上清液和沉淀（含有蛋白质、多糖、脂肪酸、细胞碎片和 DNA），RNA 分布在上清液中，收集上清液，注意不要触碰到沉淀，上清液经异丙醇沉淀便可以得到 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，请立即用大量的水冲洗并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°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和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 小时以上。
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，然后再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 水溶液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 的细胞培养皿（直径约 3.5 cm ）中加入 $1-2 \text{ ml}$ 的 RNAiso Easy，轻微晃动，确保裂解液均匀分布于细胞表面。
注：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，用移液器反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。
- ④ 室温（ $15-30^\circ\text{C}$ ）静置 5 分钟，然后按“步骤 2. Total RNA 的提取”继续操作。

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 用移液器反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。
- ④ 室温（ $15-30^\circ\text{C}$ ）静置 5 分钟，然后按“步骤 2. Total RNA 的提取”继续操作。

C. 动物组织材料

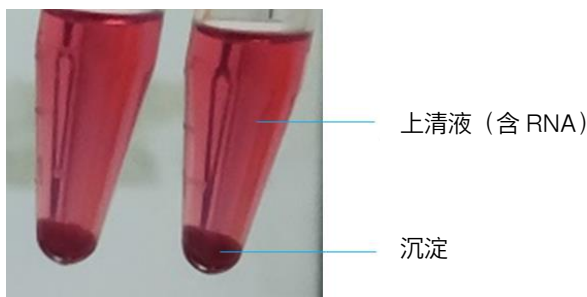
- ① 将超低温冻结的动物组织样品称量后迅速转移至用液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状（研磨不充分可能会影响 RNA 的收率和质量）。
- ② 向研钵中加入 RNAiso Easy，每 50 mg 动物组织加入 0.5 ml 的 RNAiso Easy。对于新鲜的组织样品，建议立即加入 RNAiso Easy，充分匀浆。
- ③ 将匀浆液转移至离心管中，室温（ $15-30^\circ\text{C}$ ）静置 5 分钟，然后按“步骤 2. Total RNA 的提取”继续操作。

D. 植物组织材料

- ① 将超低温冻结的植物组织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（研磨不充分可能会影响 RNA 的收率和质量）。
- ② 向研钵中加入 RNAiso Easy，每 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。
- ③ 将匀浆液转移至离心管中，室温（ $15-30^\circ\text{C}$ ）静置 5 分钟，然后按“步骤 2. Total RNA 的提取”继续操作。

2. Total RNA 的提取。

- ① 向上述“步骤 1. 实验样品的研磨和匀浆”的匀浆裂解液中加入 $2/5$ RNAiso Easy 体积的 Solution H（即每 0.5 ml RNAiso Easy，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。从离心机中取出离心管，此时在离心管底部可观察到沉淀（如下图所示，含 DNA 和蛋白质），RNA 在上清液中。



注：上图示例样品为 50 mg 动物组织，沉淀量和沉淀状态与样品投入量、样品性质和样品研磨匀

浆方法有关，部分样品会呈现半固态沉淀。当样品的投入低于建议量或样品为培养细胞时，离心后可能观察不到明显沉淀，属正常现象，可继续按步骤提取 RNA。

- ④ 使用移液器小心吸取与 RNAiso Easy 等体积的上清液至新的离心管中（切勿吸出或触碰沉淀）。
（例如使用 0.5 ml RNAiso Easy 裂解样品，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液，但需注意避免触碰沉淀，如果触碰沉淀可能会导致 RNA 纯度降低。）
- ⑤ 向新的离心管中加入与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 × g 室温离心 10 分钟。离心后，试管底部会出现 RNA 沉淀。（当样品中 RNA 含量较少时，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。

小心弃去废液，切勿触及沉淀，加入 1 ml 75%乙醇，轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁，8,000 × g 室温离心 3 分钟，小心弃去废液，切勿触及沉淀。

注：有时 RNA 沉淀可能会分散不聚集或不紧实，这种情况下要注意沿液面缓慢吸取废液，避免 RNA 损失。

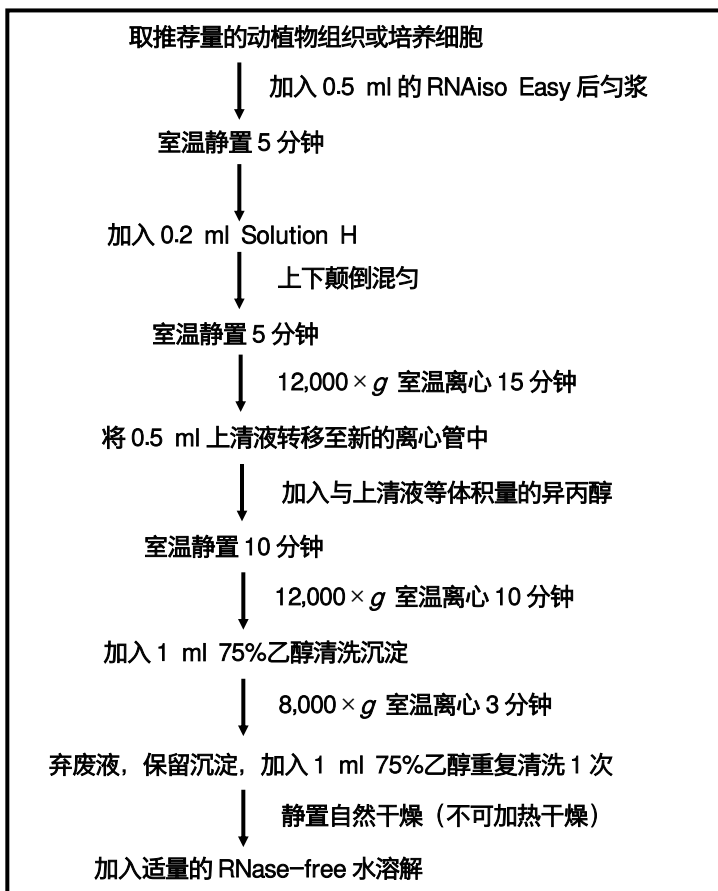
4. 重复“步骤 3. RNA 沉淀的清洗”一次（为减少杂质残留，建议应尽可能地将废液弃净，可以弃去大部分废液后，短暂离心将残留废液离心至管底，再用移液器将剩余废液吸出）。

5. RNA 的溶解。

打开离心管盖，室温放置自然干燥沉淀数分钟。沉淀干燥后，加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀。

注：不可离心或加热干燥，否则 RNA 将会难以溶解。

● 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+溴化乙锭）分析

取以上方法提取获得的1-2 μg 热变性 total RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测。对于完整的 Total RNA，2 种核糖体 RNA（真核细胞：28S 和 18S）的电泳条带亮度约为 2:1。如果核糖体 RNA 条带弥散，可能是 RNA 已降解。此外，如果 18S 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，A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.7-2.1 为好。

例：

RNA 浓度计算方法：

RNA 浓度 (μg/μl) = A₂₆₀ × 稀释倍数 × 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. A₂₆₀/A₂₈₀ 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 A₂₈₀ 值升高。
- ② 样品裂解时加入的 RNAiso Easy 量可能偏少，造成了蛋白分离不充分。可以向 RNA 溶液中加入 RNAiso Easy (2.5 倍 RNA 溶液体积量)，从“步骤 1. 实验样品的研磨和匀浆”开始重新纯化 RNA (注意：“步骤 2. Total RNA 的提取”时不需加入 Solution H)。
- 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，吸取上清液时接触沉淀造成污染。
- 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 沉淀可能会难以溶解。避免加热或离心干燥沉淀。
- ② 可以于 60℃加热 5 分钟后再于冰上溶解数小时，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 Easy 的添加量相对不足。

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. 实验样品的研磨和匀浆”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。

7. 特殊样品（如软骨、脾脏等材料）使用本品 RNA 提取效果不理想，怎么办？

由于产品原理所限，部分特殊样品的 RNA 提取效果可能会不理想，如果不能满足下游实验需要，推荐使用 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109) 处理此类样品。

● 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) Nicolaidis 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。

本文件由宝日医生物技术（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>