

RNAisol 试剂说明书

产品组成

Cat. No.	5301005	5301100
RNAisol 试剂	5.5 ml	100 ml
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

产品可室温运输，收到后请置于 2~8℃保存，有效期为 3 年。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：电话：400-0099-857，QQ: 869912443，微信公众号：simgenbio，e-mail: technical@simgen.cn。

产品介绍

RNAisol 试剂是即用型细胞和组织总 RNA 提取试剂。在溶解的样品中，RNAisol 试剂可保持 RNA 的完整性，同时能破坏细胞及溶解细胞成分。加入 Buffer EX 或氯仿离心后，样本溶解物分离成水相和有机相，RNA 存在于水相中，DNA 和蛋白质处于有机相及相间。水相中的 RNA 可通过异丙醇沉淀回收；如果有需要，有机相及相间中的 DNA 和蛋白质也可相继通过沉淀回收。

RNAisol 试剂提取的总 RNA 可用于 Northern blot 分析、斑点杂交、poly (A) + 选择、体外翻译、RNA 酶保护分析和分子克隆。RNAisol 试剂可除去样本中大部分 DNA，但不能彻底去除 DNA，因此在 RT-PCR 反应中，如果设计的两条引物位于单个外显子中时，需用 DNase I (Simgen Cat. No. 8003050) 处理分离出的 RNA，或者选择含有 DNA 酶消化步骤的 cDNA 第一链合成试剂盒 (Simgen Cat. No. 7306100) 合成 cDNA。

用户需自备的试剂与物品

1. Buffer EX (Simgen Cat. 9025100) 或氯仿、异丙醇、75%乙醇（用 DEPC 处理水配制）、RNase-free 水或者 DEPC 处理水 (Simgen Cat. 9003100)
2. RNase-free 的 1.5 ml 离心管
3. 移液器及吸头（为避免 RNA 酶的污染，请选用含滤芯的 RNase-free 吸头）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 漩涡振荡器、台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 可能需要液氮与研钵，可能需要 18-25 号针头的注射器（动物组织提取用）
7. 可能需要 Carrier RNA (Simgen Cat. 4003302)
8. 可能需要 PBS 溶液、无水乙醇、0.1 M 柠檬酸钠（溶于 10%乙醇）、8 mM NaOH（DNA 提取用）
9. 可能需要 5 ml 离心管、0.3 M 盐酸胍（溶于 95%乙醇）、1% SDS（蛋白质提取用）



RNAisol 试剂操作视频

使用前准备

1. 扫描右侧二维码了解 RNAisol 试剂操作步骤，了解“防止 RNA 酶污染的注意事项”。
2. 注意：RNAisol 试剂中含有苯酚，会腐蚀皮肤，必须戴手套进行操作，请勿直接接触试剂。如果使用氯仿，应在化学通风橱中使用，避免吸入蒸气（推荐用 Buffer EX 替代氯仿）。
3. 因为唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，所以 RNA 提取的全过程都需要戴乳胶手套和口罩。

操作步骤：

RNA 提取步骤：

本操作步骤是为用 1 ml RNAiso 试剂提取 RNA 而设计的，如果要从更多组织或细胞中提取 RNA，须将所加的 RNAiso 试剂及 Buffer EX 或氯仿、异丙醇、75%乙醇等用量按比例增加。如果从微量组织或者细胞（1~10 mg 组织或 $10^2 \sim 10^5$ 细胞）中提取 RNA，则应在步骤 4 的异丙醇沉淀步骤中补加 5~10 μg Carrier RNA，Carrier RNA 的存在不影响 RT-PCR。

1. 不同来源样品的处理：

人或动物组织：

在研钵中收集 300~500 mg 人或动物组织，加入液氮冷冻后将组织研磨至粉末状，再用液氮预冷过的 1.5 ml 离心管称取 50~100 mg 研磨成粉末状的组织，加入 1 ml RNAiso 试剂，直接用吸头吹打或旋涡振荡直至无明显团块；也可直接称取 50~100 mg 人或动物组织，加入 1 ml RNAiso 试剂，用匀浆器匀浆，进入步骤 3 的操作。

* 尽量在组织粉末尚未融化前加入 RNAiso 试剂，以减少组织内源性的 RNA 酶对 RNA 的降解。

* 样本溶解后若发现液体很粘稠，应该是样本中核酸含量过多导致，可用装有 18-25 号针头的注射器反复抽吸 8~10 次帮助 RNA 释放（注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生）。

培养的动物细胞：

贴壁培养的细胞：每 10 cm^2 培养细胞中加入 1 ml RNAiso 试剂（比如直径为 3.5 cm 的细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入 1 ml RNAiso 试剂），勿弃吸头，直接用吸头吹打数次使细胞溶解，吸取匀浆液转移到一个 1.5 ml 离心管中，进入步骤 3 的操作。

* 对于贴壁牢固的细胞可采用细胞刮或者洁净的枪头剥离，也可在加入 RNAiso 试剂之前采用胰酶消化处理细胞，然后按照下文“悬浮培养的细胞”进行操作。

悬浮培养的细胞：用 1.5 ml 离心管离心收集 $5 \sim 10 \times 10^6$ 细胞，加 100 μl PBS 溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮，加入 1 ml RNAiso 试剂，勿弃吸头，直接用吸头吹打数次使细胞溶解，进入步骤 3 的操作。

植物组织 / 植物细胞 / 酵母 / 细菌：

在研钵中收集 300~500 mg 样品，加入液氮冷冻后将样品研磨至粉末状，再用液氮预冷的 1.5 ml 离心管称取约 100 mg 研磨成粉末状的样品，加入 1 ml RNAiso 试剂，勿弃吸头，直接用吸头吹打样品数次使其溶解，进入步骤 3 的操作。

* 对于酵母和细菌，可离心收集 $5 \sim 10 \times 10^6$ 酵母或 1×10^7 细菌，经溶壁酶或溶菌酶处理后，4000 $\times g$ 离心 30 秒，用移液器吸弃上清，保留少于 100 μl 的体积，旋涡振荡悬浮菌体，加入 1 ml RNAiso 试剂，勿弃吸头，直接用吸头吹打数次使菌体溶解，进入步骤 3 的操作。

2. **可选步骤：**若样品中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或胞外物质（肌肉，植物结节部分等），可于 12000 $\times g$ 离心 5 分钟，取上清。离心得到的沉淀中包含细胞外膜，多糖，高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织时，顶层所含的大量油脂应去除，取离心后澄清的溶液进入下一步操作。

3. 加入 200 μl Buffer EX 或氯仿，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 $\times g$ 离心 15 分钟。

* 氯仿挥发性强且有剧毒性，如果使用氯仿，此步骤应在化学通风橱中操作，以避免吸入氯仿。

4. 取一个 RNase-free 1.5 ml 离心管，加入 500 μl 异丙醇，将步骤 3 中离心形成的清澈上相转移到装有异丙醇的 1.5 ml 离心管中。盖上管盖，混合均匀，12000 $\times g$ 离心 10 分钟。

* 注意不要吸取相间沉淀，以免影响 RNA 的纯度。

5. 弃上清，加入 1 ml 75%乙醇，盖上管盖，旋涡振荡悬浮沉淀，7500 $\times g$ 离心 5 分钟。

* RNA 含量少的样本可能观察不到沉淀，继续按照流程操作即可。

6. 弃上清，盖上管盖，低速离心数秒使管壁上的乙醇沉降到管底。用 200 μl 吸头吸尽残留的乙醇，保留管底及管壁的白色 RNA 沉淀。室温开盖静置 5 分钟干燥 RNA。

* 从某些样本中提取 RNA 时，RNA 不是在离心管管底形成白点，而是会以均匀的薄雾状沉淀形式吸附在管壁上。请注意仔细观察并在步骤 7 操作时特别留意将 RNase-free 水加到管壁的相应位置上溶解 RNA。

7. 加入 50~100 μl RNase-free 水溶解 RNA，提取的 RNA 可立即用于后续实验，或者储存于 -70°C 以下备用。

DNA 提取步骤：

本操作步骤是衔接上文用 1 ml RNAiso 试剂提取 RNA 的步骤而设计的，如果要从更多组织或细胞中提取 DNA，须将所加的无水乙醇、0.1 M 柠檬酸钠（溶于 10% 乙醇）、75% 乙醇等用量按比例增加。

1. 按照 RNA 提取步骤操作到步骤 3，移去水相后，加入 300 μ l 无水乙醇，盖上管盖，上下颠倒混合均匀，室温静置 2~3 分钟，2000 $\times$ g 离心 5 分钟沉淀 DNA，吸弃苯酚-乙醇上清液（如需要，可保留上清用于蛋白质分离）。

* 移去水相后剩余的有机相和中间相可在 2~8 $^{\circ}$ C 保存过夜。

* 仔细移去水相，对于分离 DNA 的质量很重要。

2. 加入 1 ml 0.1 M 柠檬酸钠（溶于 10% 乙醇），盖上管盖，室温静置 30 分钟（间歇混匀 DNA 沉淀），2000 $\times$ g 离心 5 分钟，弃上清。

3. 重复步骤 2 一次。

* 对于 200 μ g 以上的 DNA 或含有较多非 DNA 物质的大沉淀，需要增加 0.1 M 柠檬酸钠（溶于 10% 乙醇）的洗涤次数。

4. 加入 1.5 ml 75% 乙醇悬浮沉淀的 DNA，室温静置 10~20 分钟（间歇混匀），2000 $\times$ g 离心 5 分钟。

* 悬浮于 75% 乙醇的 DNA 可在 2~8 $^{\circ}$ C 下保存数月。

5. 弃上清，盖上管盖，低速离心数秒使管壁上的乙醇沉降到管底。用 200 μ l 吸头吸尽残留的乙醇，保留管底的白色 DNA 沉淀。室温开盖静置 5~15 分钟干燥 DNA。

6. 加入 200~600 μ l 8 mM NaOH 溶解 DNA，提取的 DNA 可立即用于后续实验，或者储存于 -20 $^{\circ}$ C 以下备用。

* 必须用弱碱溶解 DNA，因为沉淀的 DNA 在水中或 Tris 缓冲液中可能无法溶解。

* DNA（尤其是来自组织的 DNA）中若含有不溶性胶状物（膜碎片等），则 12000 $\times$ g 离心 10 分钟，将含 DNA 的上清转移到一个新管。

* 如果获得的 DNA 纯度差（A260/280 比值 < 1.70），可选择 DNA 纯化试剂盒（Simgen Cat. No. 2101050）纯化 DNA 后再使用。

蛋白质提取步骤：

本操作步骤是衔接上文 DNA 提取步骤而设计的，如果要从更多组织或细胞中提取蛋白质，须将所加的异丙醇、0.3 M 盐酸胍（溶于 95% 乙醇）、无水乙醇等用量按比例增加。用乙醇沉淀 DNA 后，蛋白质可从苯酚-乙醇上清中获得。由此提取的蛋白质可用于 Western blotting 分析。

1. 取 5 ml 离心管，加入 1.5 ml 异丙醇，将 DNA 提取步骤 1 中的苯酚-乙醇上清液加入并混合均匀。室温静置 10 分钟，12000 $\times$ g 离心 10 分钟，弃上清。

2. 加入 2 ml 0.3 M 盐酸胍（溶于 95% 乙醇），旋涡振荡悬浮蛋白质沉淀。室温静置 20 分钟，7500 $\times$ g 离心 5 分钟，弃上清。

3. 重复步骤 2 两次。

4. 加入 2 ml 无水乙醇，旋涡振荡混匀蛋白质沉淀。室温静置 20 分钟，7500 $\times$ g 离心 5 分钟。

* 用 0.3 M 盐酸胍（溶于 95% 乙醇）或无水乙醇悬浮的蛋白质沉淀可在 2~8 $^{\circ}$ C 保存至少一个月，或在 -20 $^{\circ}$ C 保存至少一年。

5. 弃上清，盖上管盖，低速离心数秒使管壁上的乙醇沉降到管底。用 200 μ l 吸头吸尽残留的乙醇，保留管底的蛋白质沉淀。室温开盖静置 5~10 分钟干燥蛋白质。

6. 加入 200 μ l 1% SDS，反复吹打帮助沉淀溶解。蛋白质沉淀的完全溶解可能需要在 50 $^{\circ}$ C 孵育。

7. 10000 $\times$ g 离心 10 分钟，将含蛋白质的上清转移到一个新管，提取的蛋白质可直接用于 Western blotting 分析，或者储存于 -20 $^{\circ}$ C 以下备用。

* 为更有效地回收蛋白，可采用下述替代方法：在 2~8 $^{\circ}$ C，更换 3 次 0.1% SDS，透析苯酚-乙醇上清。透析物 10000 $\times$ g 离心 10 分钟，上清用于 Western blotting 分析。

常见问题与分析：

1. RNA 降解

- 1) 样本保存或处理不当。组织样本若不能立即提取，取材后应立即置于液氮中速冻，然后移至 -70℃冰箱保存；细胞样本应在收集后直接加入 1 ml RNAisol 试剂，然后移至 -70℃冰箱保存。不要直接将组织放在 -70℃冰箱冷冻，冷冻过程缓慢，内源 RNase 可能会将 RNA 降解。如果不具备液氮速冻的条件，可选购 RNA 样本保存液 (Simgen Cat. No. 4007100) 保存样本。当使用 RNA 样本保存液时，应注意以下事项：
 - A. 只选用新鲜的、未反复冻融的样本加入 RNA 样本保存液保存；
 - B. 样本中加入 RNA 样本保存液后不要长时间室温存放。RNA 样本保存液保存样本是有时间期限的，一般在 37℃ 只能保存 1 天，在 15~25℃ 可保存 1 周，在 4℃ 可保存 1 个月，在 -20℃ 以下可长期保存。
- 2) 内源 RNA 酶影响。样本取出后应立即加液氮研磨，或立即加 RNAisol 试剂进行匀浆，避免内源 RNA 酶降解 RNA。
- 3) 外源 RNA 酶的污染。试剂、耗材、器械及实验环境中的 RNA 酶进入实验系统。请特别注意了解“RNAisol 试剂操作视频”中“防止 RNA 酶污染的注意事项”，并着手改善实验条件和实验环境，确保在无 RNA 酶污染的条件下提取和使用 RNA。
- 4) 电泳检测时，推荐使用甲醛变性胶电泳（参考分子克隆第三版第 540 页）。如果没有甲醛变性胶电泳的条件，关注 simgenbio 微信公众号查询“如何做好 RNA 电泳实验”文章，获取相关实验技巧。

2. RNA 提取得率低

- 1) 多糖含量非常高的样本，比如一些植物的块茎、果实、种子及衰老的叶片（主要是淀粉类的多糖衍生物），软骨组织（软骨属于多糖类物质），虾、蟹、昆虫等甲壳动物的外壳（主要成分甲壳质属于多糖类物质）等，虽然能看到沉淀，但实际上主要的沉淀物是多糖，RNA 的得率可能非常低。主要原因是多糖类物质会和 RNAisol 试剂形成不可溶解的沉淀，严重影响了 RNA 的释放。以上问题通常都可以通过替换植物总 RNA 试剂盒 (Simgen Cat. No. 5101050) 重新提取 RNA 得到解决；但如果是果肉类样本（水分含量高的），应选择果肉总 RNA 试剂盒 (Simgen Cat. No. 5102050)；一些产生特殊粘多糖的植物或真菌样本，用植物总 RNA 试剂盒提取 RNA 时可能会堵塞纯化柱，如果有上述堵柱现象发生，则必须选择高多糖多酚植物总 RNA 试剂盒 (Simgen Cat. No. 5103050) 提取 RNA。
- 2) 样本 RNA 含量低。请增加样本用量。
- 3) 样本未充分裂解或匀浆不彻底。将样本切成小块，延长研磨或匀浆时间，并用移液器反复吹打混匀。
- 4) RNA 沉淀没有被完全溶解。增加 RNase-free 水的体积或延长溶解时间。

3. 基因组 DNA 残留

- 1) 样本用量过多或样本中核酸含量较高。请减少样本用量，或者在样本裂解后按每 1 ml RNAisol 试剂加入 5 μ l 乙酸的比例添加乙酸，混匀后再进行后续操作。
- 2) 吸取水相时吸到了中间相。小心缓慢地吸取水相，宁可少吸取水相也不要吸到中间相。若不慎吸收到中间相，可将液体打回离心管，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟后更换新吸头重新吸取水相。
- 3) 分相没有完全分开。加入 Buffer EX 后确保用力摇晃混匀，不要用旋涡振荡代替摇晃。
- 4) 样本预先用其他试剂处理过。确保起始样本不含有机溶剂（例如乙醇、DMSO）、强缓冲液或碱性试剂，这些试剂会干扰相分离。

4. RNA 后续实验效果不佳

- 1) 盐分残留过多。增加 75%乙醇的洗涤次数，并用移液器吹打或剧烈旋涡振荡的方法打散 RNA 沉淀，帮助洗涤沉淀内部的杂质。推荐选用超纯总 RNA 提取试剂盒 (Simgen Cat. No. 5003050) 取代 RNAisol 试剂提取 RNA，不仅操作步骤更简便，还可确保提取到高纯度的 RNA。
- 2) 乙醇残留过多。步骤 6 操作不可省略。
- 3) 提取的 RNA 出现了降解。请将提取好的 RNA 保存在 -70℃ 以下。在使用 RNA 的过程中注意防止 RNA 酶污染。
- 4) 使用了过多的 RNA 用作反转录模板。通常 20 μ l 反转录反应体系中加入 100~1000 ng RNA 作为模板比较适宜。注意 cDNA 作为 PCR 模板时需要适当稀释，以免残留的反转录酶（包括已经失活的反转录酶）干扰 Taq 酶的活性。
- 5) 反转录后的 DNA-RNA 复合体对荧光 PCR 的影响。建议减少随机引物的用量或用特异性引物进行反转录，或者在反转录后添加 RNase H 进行处理，去除 DNA-RNA 复合体。