

Code No. 9767

研究用

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST Universal
RNA Extraction Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存与运输	1
● 预防 RNase 污染的注意事项	2
● 使用前的注意事项	2
● 不同组织的适宜起始量和裂解 Buffer RL 使用量	2
● 试剂盒操作流程简图	3
● 操作方法	3
● 实验例	7
● 不同组织的 RNA 提取量	8
● 附注	8
● Q&A	9

● 制品说明

本试剂盒是用于提取培养细胞及动物组织、植物组织（植物幼嫩的叶、茎等）（Cultured cells/Animal Tissue/Plant Tissue）等 RNA 的广谱型小量纯化试剂盒。试剂盒采用了特别的细胞裂解系统，无需苯酚氯仿抽提等步骤，简单快捷。组织或细胞通过匀浆裂解或液氮研磨后在裂解液中释放核酸，裂解液分别经过 gDNA Eraser Spin Column（去除基因组 DNA）以及 RNA Spin Column（结合 RNA），从而达到提取高质量 RNA 的目的。

本试剂盒具有高效、快速、方便之特点，组织或细胞裂解后，提取操作仅需 20 分钟便可完成。利用该试剂盒提取的 RNA 纯度高，很少含蛋白质及基因组 DNA 污染。使用本试剂盒可从 $1.0E+05 \sim 1.0E+07$ 培养细胞、5~40 mg 动物组织或 50~100 mg 植物组织中纯化得到多至数十微克的高纯度 RNA。提取得到的 RNA 可以直接用于 Northern 杂交、斑点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RNA 分解酶的保护分析、RT-PCR、Real Time RT-PCR、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

利用本试剂盒中的 gDNA Eraser Spin Column（去除基因组 DNA）可以进行简单的基因组 DNA 提取。提取的 DNA 可以用于 PCR 反应等分子生物学实验^{*1}。

*1 有关基因组 DNA 的提取请参考附注。

● 制品内容（50 次量）

本试剂盒分为 Part I 和 Part II 两部分。

■ Part I -20℃保存

50×DTT Solution	700 μl
Recombinant DNase I (RNase-free; 5 U/μl)	1,000 U
10×DNase I Buffer	1 ml

■ Part II 室温（15℃~25℃）下保存

Buffer RL ^{*2}	32 ml
Buffer RWA ^{*2}	28 ml
Buffer RWB ^{*3}	30 ml
RNase Free dH ₂ O	15 ml
gDNA Eraser Spin Column	50 支
RNA Spin Column	50 套
Collection Tube (2 ml)	50 支
RNase Free Collection Tube (1.5 ml)	50 支

*2 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。

*3 首次使用前，向 Buffer RWB 中添加 70 ml 的 100%乙醇。

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆无水乙醇
- ◆70%乙醇（0.1% DEPC 处理水配制）
- ◆PBS Buffer

● 保存与运输

1. 本试剂盒中的 Part I 请于-20℃保存和运输。
2. 本试剂盒中的 Part II 请于室温（15℃~25℃）下保存和运输。

● 预防 RNase 污染的注意事项

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°C 下处理 12 小时。

(2) 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。

◆ 试剂配制

用于 RNA 实验的试剂，须使用干热灭菌（180°C，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。

● 使用前的注意事项

◆ Buffer RL 若出现沉淀，请于 60°C 加热溶解，待恢复至室温后使用。

◆ 操作前请在 Buffer RL 中加入 50×DTT Solution 至终浓度为 2%，即每 1 ml 的 Buffer RL 中加入 20 μl 的 50×DTT Solution。此裂解 Buffer 最好现用现配。加入 50×DTT Solution 的 Buffer RL 可在室温放置 1 个月。

◆ Buffer RWB 在首次使用前，请添加 70 ml 的 100% 乙醇，混合均匀。

◆ gDNA Eraser Spin Column 以及 RNA Spin Column 的最大容积为 600 μl，使用时如果液体的体积超出最大容积，请分批加入。

◆ 以下实验操作，如无特殊说明，均在室温进行。

● 不同组织的适宜起始量和裂解 Buffer RL 使用量

组织或细胞的起始量对 RNA 的提取效果有很大影响。若组织的起始量过多，RNA 的质量和相对收量都会有所降低。一般来说，使用该试剂盒能够对 1.0E+05~1.0E+07 培养细胞、5~40 mg 冻存或新鲜的动物组织、50~100 mg 冻存或新鲜的植物组织进行 RNA 的提取。培养细胞的适宜起始量为 1.0E+06，动物组织的适宜起始量为 10 mg，植物组织的适宜起始量为 50 mg。对于 gDNA 含量较高的组织（如脾脏、肾脏等）应减少起始量，对于植物组织（植物的茎、根等）以及较难裂解的动物组织（如肺、心脏等），除应当降低样品的起始量外，还应当加大裂解 Buffer RL（使用前需加入终浓度为 2% 的 50×DTT Solution）的用量。在实验之前，请参考 Table 1 中不同组织的适宜起始量和裂解 Buffer RL 的使用量。

样品起始量	裂解 Buffer RL 的适宜使用量
贴壁培养细胞（培养皿直径 < 6 cm）	350 μl
贴壁培养细胞（培养皿直径 6~10 cm）	600 μl
< 5 × 10 ⁶ 的悬浮培养细胞	350 μl
5 × 10 ⁶ ~ 1 × 10 ⁷ 悬浮培养细胞	600 μl
5~20 mg 普通动物组织（脑、肝脏等）	350 μl
20~40 mg 普通动物组织（脑、肝脏等）	600 μl
5~20 mg 特殊组织（肺、肾脏、脾等）	350 μl
20~40 mg 特殊组织（肺、肾脏、脾等）	600 μl
50~100 mg 植物组织（叶片、茎）	500 μl

Table 1 不同组织的适宜起始量和裂解 Buffer RL 的使用量

● 试剂盒操作流程简图

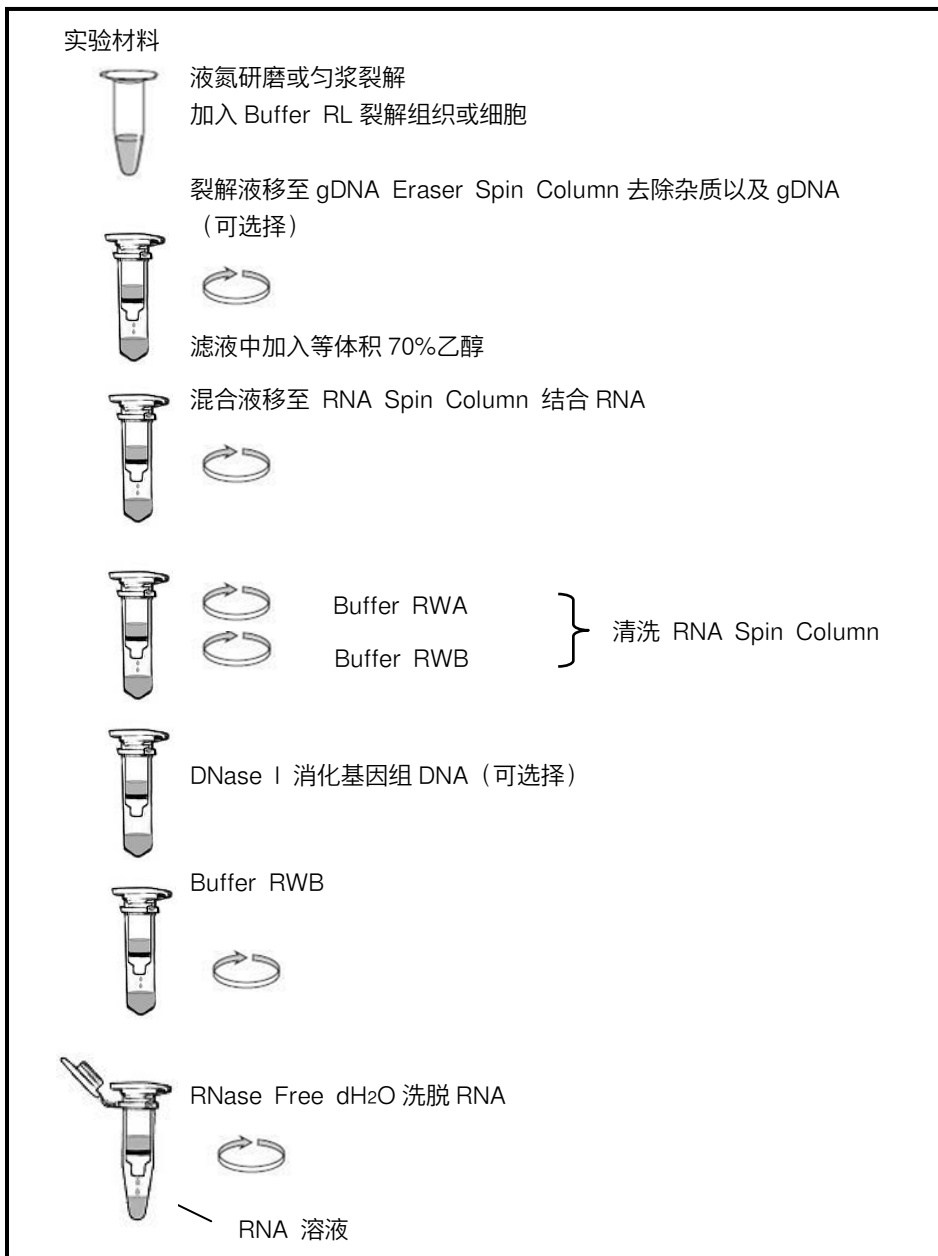


图 1: 操作流程简图

● 操作方法

动物培养细胞的 RNA 提取

1. 细胞的裂解。

悬浮培养的动物细胞裂解：

- 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。
- ② 使用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗一次， $8,000 \times g$ 4°C 离心 2 分钟，弃上清。
向收集的细胞中加入适当量 (Table 1 中推荐的使用量) 的裂解 Buffer RL (使用前请确认已加入 $50 \times \text{DTT Solution}$)。
- ③ 使用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。

贴壁培养细胞的裂解：

- ① 倒出培养液，使用 $1 \times$ PBS 清洗一次。
- ② 向培养细胞中加入适当量 (Table 1 中推荐的使用量) 的裂解 Buffer RL (使用前请确认已加入 $50 \times$ DTT Solution)，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。

2. 裂解液室温静置 2 分钟。

注：对于基因组含量较多的材料或者材料起始量较大时，可以直接按步骤 7 进行 (否则 DNA 含量过高可能造成 gDNA Eraser Spin Column 堵塞)，如基因组含量较低或材料起始量较少时，可按步骤 3-6 进行。

3. 将 gDNA Eraser Spin Column 安放到 2 ml 的 Collection Tube (试剂盒提供) 上。
4. 将裂解液转移入到 gDNA Eraser Spin Column 中。
5. 12,000 rpm，离心 1 分钟。
6. 弃 gDNA Eraser Spin Column (进行基因组 DNA 提取时请保留)。保留 2 ml Tube 中的滤液。
7. 向上述步骤 2 或步骤 6 中加入与液体等体积的 70%乙醇 (此时可能会出现沉淀)，使用移液枪将溶液混合均匀。
8. 立即将混合液 (含沉淀) 全部转入到 RNA Spin Column (含 2 ml Collection Tube) 中。(如果混合液的体积大于 $600 \mu\text{l}$ ，请分批加入，每次加入的体积不要大于 $600 \mu\text{l}$ 。)
9. 12,000 rpm，离心 1 分钟，弃滤液。将 RNA Spin Column 放回到 2 ml Collection Tube 中。
10. 将 $500 \mu\text{l}$ 的 Buffer RWA 加入至 RNA Spin Column 中，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。
11. 将 $600 \mu\text{l}$ 的 Buffer RWB 加入至 RNA Spin Column 中，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。

注) 请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。

请沿 RNA Spin Column 管壁四周加入 Buffer RWB，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。

12. DNase I 消化 (可选择)：

利用本试剂盒中的 gDNA Eraser Spin Column 以及 RNA Spin Column 可以有效地去除培养细胞中绝大部分的基因组 DNA，提取的 RNA 很少含基因组 DNA。若后续实验对 RNA 纯度要求比较严格，可以选择性地在 RNA Spin Column 膜上进行 DNase I 消化。

- ① DNase I 反应液的配制：取 $5 \mu\text{l}$ $10 \times$ DNase I Buffer， $4 \mu\text{l}$ Recombinant DNase I (RNase free, $5 \text{ U}/\mu\text{l}$)， $41 \mu\text{l}$ RNase free dH_2O 到新的 1.5 ml RNase Free Tube 中，混合均匀。
- ② 向 RNA Spin Column 膜中央加入 $50 \mu\text{l}$ DNase I 反应液，室温静置 15 分钟。
- ③ 向 RNA Spin Column 膜中央加入 $350 \mu\text{l}$ 的 Buffer RWB，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。

13. 重复操作步骤 11。

14. 将 RNA Spin Column 重新安置于 2 ml Collection Tube 上，12,000 rpm 离心 2 分钟。

15. 将 RNA Spin Column 安置于 1.5 ml 的 RNase Free Collection Tube (试剂盒提供) 上，在 RNA Spin Column 膜中央处加入 $50 \sim 200 \mu\text{l}$ 的 RNase Free dH_2O 或 0.1% DEPC 处理水，室温静置 5 分钟。

16. 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。

17. 若想提高 RNA 的收量，可再向 RNA Spin Column 膜中央加入 $50 \sim 200 \mu\text{l}$ 的 RNase Free dH_2O 或 0.1% DEPC 处理水洗脱 RNA；若要得到高浓度的 RNA，也可以将第一次的洗脱液重新加回至 RNA Spin Column 中，室温静置 5 分钟，12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。

动物组织的 RNA 提取

1. 组织的裂解。

普通的动物组织可以按照下列三种方法进行裂解：

① 将新鲜的或超低温冻存的动物组织样品迅速转移至液氮预冷的研钵中，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）。将研磨成粉末状的样品加入到含有裂解 Buffer RL（按 Table 1 中推荐的使用量，且在使用前确认已加入 50×DTT Solution）的 1.5 ml 灭菌 tube 中，用移液器反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。

② 将新鲜的或超低温冻存的样品迅速加入到 1.5 ml 灭菌 tube 中，加入 Table 1 中推荐量的裂解 Buffer RL（使用前请确认已加入 50×DTT Solution）后利用组织破碎仪进行破碎，然后用移液器反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。

③ 将新鲜的或超低温冻存的样品迅速加入到匀浆管中，加入 Table 1 中推荐量的裂解 Buffer RL（使用前请确认已加入 50×DTT Solution），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，然后用移液器反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。将样品转移至灭菌 tube 中。

特殊动物组织的裂解（含 gDNA 较多的组织以及较难裂解的组织）：

将新鲜的或超低温冻存的动物组织样品迅速转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状（无明显可见颗粒，如果没有研磨彻底会影响 RNA 的收率和质量）。将研磨成粉末状的样品加入到含有裂解 Buffer RL（按 Table 1 中推荐的使用量，且在使用前确认已加入 50×DTT Solution）的 1.5 ml 灭菌 tube 中，用移液器反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。

注）组织的充分裂解和匀浆是提取高质量 RNA 的关键。因此在裂解时如果匀浆液比较粘稠，可以使用 20-gauge 的注射器针头反复吹打样品 5-10 次。然后按照下列步骤进行。

2. 将裂解液在 12,000 rpm, 4°C 离心 5 分钟。
3. 小心吸取上清液到新的 1.5 ml RNase Free Tube 中。

注：对于基因组含量较多的材料或者材料起始量较大时，可以直接按步骤 8 进行（否则 DNA 含量过高可能造成 gDNA Eraser Spin Column 堵塞），如基因组含量较低或材料起始量较少时，可按步骤 4-7 进行。

4. 将 gDNA Eraser Spin Column 安放到 2 ml 的 Collection Tube（试剂盒提供）上。
5. 将上清液转移入到 gDNA Eraser Spin Column 中。
6. 12,000 rpm，离心 1 分钟。
7. 弃 gDNA Eraser Spin Column（进行基因组 DNA 提取时请保留）。保留 2 ml Tube 中的滤液。
8. 向上述步骤 3 或步骤 7 中加入与液体等体积的 70%乙醇（此时可能会出现沉淀），使用移液枪将溶液混合均匀。
9. 立即将混合液（含沉淀）全部转入到 RNA Spin Column（含 2 ml Collection Tube）中。（如果混合液的体积大于 600 μ l，请分批加入，每次加入的体积不要大于 600 μ l。）
10. 12,000 rpm，离心 1 分钟，弃滤液。将 RNA Spin Column 放回到 2 ml Collection Tube 中。
11. 将 500 μ l 的 Buffer RWA 加入至 RNA Spin Column 中，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。
12. 将 600 μ l 的 Buffer RWB 加入至 RNA Spin Column 中，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。

注）请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。

请沿 RNA Spin Column 管壁四周加入 Buffer RWB，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。

13. DNase I 消化（可选择）：

利用本试剂盒中的 gDNA Eraser Spin Column 以及 RNA Spin Column 可以有效地去除大部分的基因组 DNA，提取的 RNA 很少含基因组 DNA。对于部分基因组 DNA 含量较高的组织材料（如肝脏、脾脏、肺、胸腺等）或后续实验对 RNA 纯度要求比较严格，可以选择性地在 RNA Spin Column 膜上进行 DNase I 消化。

- ① DNase I 反应液的配制: 取 5 μ l 10 \times DNase I Buffer, 4 μ l Recombinant DNase I (RNase free, 5 U/ μ l), 41 μ l RNase free dH₂O 到新的 1.5 ml RNase Free Tube 中, 混合均匀。
 - ② 向 RNA Spin Column 膜中央加入 50 μ l DNase I 反应液, 室温静置 15 分钟。
 - ③ 向 RNA Spin Column 膜中央加入 350 μ l 的 Buffer RWB, 12,000 rpm 离心 30 秒钟, 弃滤液。
14. 重复操作步骤 12。
 15. 将 RNA Spin Column 重新安置于 2 ml Collection Tube 上, 12,000 rpm 离心 2 分钟。
 16. 将 RNA Spin Column 安置于 1.5 ml 的 RNase Free Collection Tube (试剂盒提供) 上, 在 RNA Spin Column 膜中央处加入 50~200 μ l 的 RNase Free dH₂O 或 0.1% DEPC 处理水, 室温静置 5 分钟。
 17. 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。
 18. 若想提高 RNA 的收量, 可再向 RNA Spin Column 膜中央加入 50~200 μ l 的 RNase Free dH₂O 或 0.1% DEPC 处理水洗脱 RNA; 若要得到高浓度的 RNA, 也可以将第一次的洗脱液重新加回至 RNA Spin Column 中, 室温静置 5 分钟, 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。

植物组织的 RNA 提取

1. 将新鲜的或超低温冻存的植物组织样品迅速转移至液氮预冷的研钵中, 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)。将研磨成粉末状的样品加入到含有裂解 Buffer RL (按 Table 1 中推荐的使用量, 且在使用前确认已加入 50 \times DTT Solution) 的 1.5 ml 灭菌 tube 中, 用移液器反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。

注) 组织的充分裂解和匀浆是提取高质量 RNA 的关键。因此在裂解时如果匀浆液比较粘稠, 可以利用 20-gauge 的注射器针头反复吹打样品 5-10 次, 然后按照下列步骤进行。

2. 将裂解液在 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟。
 3. 小心吸取上清液到新的 1.5 ml RNase Free Tube 中。
- 注: 对于基因组含量较多的材料或者材料起始量较大时, 可以直接按步骤 8 进行 (否则 DNA 含量过高可能造成 gDNA Eraser Spin Column 堵塞), 如基因组含量较低或材料起始量较少时, 可按步骤 4-7 进行。**
4. 将 gDNA Eraser Spin Column 安放到 2 ml 的 Collection Tube (试剂盒提供) 上。
 5. 将上清液转移到 gDNA Eraser Spin Column 中。
 6. 12,000 rpm, 离心 1 分钟。
 7. 弃 gDNA Eraser Spin Column (进行基因组 DNA 提取时请保留)。保留 2 ml Tube 中的滤液。
 8. 向上述步骤 3 或步骤 7 中加入液体 1/2 体积的无水乙醇 (此时可能会出现沉淀), 使用移液枪将溶液混合均匀。
 9. 立即将混合液 (含沉淀) 全部转入到 RNA Spin Column (含 2 ml Collection Tube) 中。(如果混合液的体积大于 600 μ l, 请分批加入, 每次加入的体积不要大于 600 μ l。)
 10. 12,000 rpm, 离心 1 分钟, 弃滤液。将 RNA Spin Column 放回到 2 ml Collection Tube 中。
 11. 将 500 μ l 的 Buffer RWA 加入至 RNA Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 30 秒钟, 弃滤液。
 12. 将 600 μ l 的 Buffer RWB 加入至 RNA Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 30 秒钟, 弃滤液。

注) 请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。

请沿 RNA Spin Column 管壁四周加入 Buffer RWB, 这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。

13. DNase I 消化 (可选择):
利用本试剂盒中的 gDNA Eraser Spin Column 以及 RNA Spin Column 可以有效地去除大部分的基因组 DNA, 提取的 RNA 很少含基因组 DNA。对于部分基因组 DNA 含量较高的组织材料或后续实验对 RNA 纯度要求比较严格, 可以选择性地在 RNA Spin Column 膜上进行 DNase I 消化。

- ① DNase I 反应液的配制: 取 5 μ l 10 \times DNase I Buffer, 4 μ l Recombinant DNase I (RNase -free, 5 U/ μ l), 41 μ l RNase Free dH₂O 到新的 1.5 ml RNase Free Tube 中, 混合均匀。
 - ② 向 RNA Spin Column 膜中央加入 50 μ l DNase I 反应液, 室温静置 15 分钟。
 - ③ 向 RNA Spin Column 膜中央加入 350 μ l 的 Buffer RWB, 12,000 rpm 离心 30 秒钟, 弃滤液。
14. 重复操作步骤 12。
 15. 将 RNA Spin Column 重新安置于 2 ml Collection Tube 上, 12,000 rpm 离心 2 分钟。
 16. 将 RNA Spin Column 安置于 1.5 ml 的 RNase Free Collection Tube (试剂盒提供) 上, 在 RNA Spin Column 膜中央处加入 50~200 μ l 的 RNase Free dH₂O 或 0.1% DEPC 处理水, 室温静置 5 分钟。
 17. 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。
 18. 若想提高 RNA 的收量, 可再向 RNA Spin Column 膜中央加入 50~200 μ l 的 RNase Free dH₂O 或 0.1% DEPC 处理水洗脱 RNA; 若要得到高浓度的 RNA, 也可以将第一次的洗脱液重新加回至 RNA Spin Column 中, 室温静置 5 分钟, 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。

● 实验例

1. 从哺乳动物培养细胞中提取 RNA 的实验例

使用本试剂盒从 1.0E+06 HL60 细胞中提取 RNA, 得到了约 10 μ g RNA, 其电泳结果见图 2。

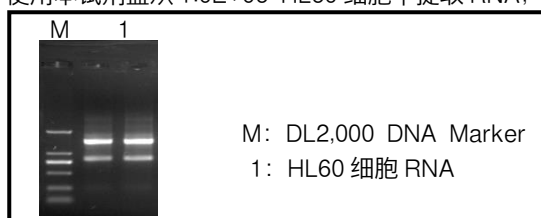


图 2. 从哺乳动物培养细胞中提取 RNA

2. 从动物组织中提取 RNA 的实验例

使用本试剂盒从 5~10 mg 的小鼠各种组织中提取 RNA, 得到了高纯度的 RNA, 其电泳结果见图 3。

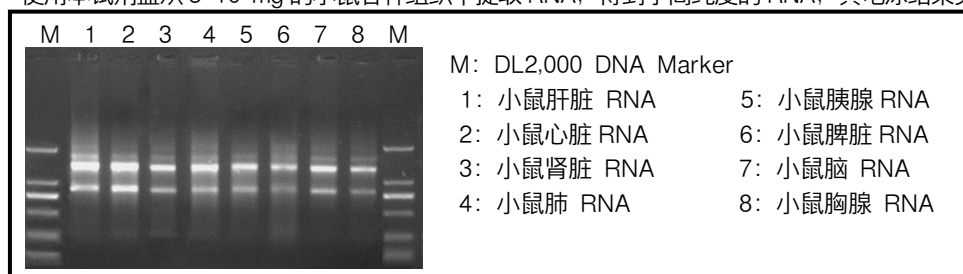


图 3. 从动物组织中提取 RNA

3. 从植物组织中提取 RNA 的实验例

使用本试剂盒从 50 mg 的玉米叶片和柳树叶片中提取 RNA, 其电泳结果见图 4。

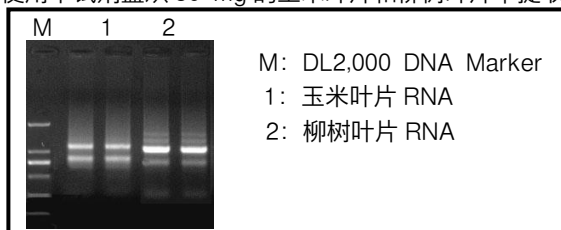


图 4. 从植物组织中提取 RNA

● 不同组织的 RNA 提取量

本试剂盒对不同组织以及细胞的 RNA 提取量见 Table 2。（组织或细胞的 RNA 提取量与其新鲜程度或生长状态有关，下表仅供参考。）

样品种类	样品名称	RNA 收量
动物组织	小鼠肝脏	30~50 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$
	小鼠心脏	5~10 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$
	小鼠肾脏	20~30 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$
	小鼠胰腺	5~15 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$
	小鼠脾脏	20~30 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$
	小鼠胸腺	10~20 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$
	小鼠肺	10~20 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$
	小鼠脑	5~10 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$
	大鼠肌肉	2~4 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$
植物组织	玉米叶片	30~40 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$
	葫芦叶片	10~15 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$
	柳树叶片	40~50 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$
	绿豆叶片	15~20 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$
细胞	HL60 细胞	8~15 $\mu\text{g}/10^6\text{ cells}$

Table 2 不同组织的 RNA 提取量

● 附注：基因组 DNA 的提取（仅供参考）

使用本试剂盒中的 gDNA Eraser Spin Column（去除基因组 DNA）可以进行简单的基因组 DNA 提取，但不能保证 gDNA 的收量和纯度，请选择性使用。提取流程如下：

1. 按照各种组织 RNA 提取步骤 1-6（动物培养细胞按照 1-5 进行操作）操作方法对样品进行处理。
2. 将 gDNA Eraser Spin Column 重新安放到新的 2 ml Collection Tube（试剂盒提供）中。
3. 将 500 μl 的 Buffer RWA 加入至 gDNA Eraser Spin Column 中，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。
4. 将 600 μl 的 Buffer RWB 加入至 gDNA Eraser Spin Column 中，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。

注) 请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。

请沿 gDNA Eraser Spin Column 管壁四周加入 Buffer RWB，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。

5. 重复操作步骤 4。
6. 将 gDNA Eraser Spin Column 重新安置于 2 ml Collection Tube 上，12,000 rpm 离心 2 分钟。
7. 将 gDNA Eraser Spin Column 安放到新的 1.5 ml Tube 上，在膜中央处加入 50 μl 的 dH₂O 或 TE Buffer，室温静置 5 分钟。
8. 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。

● Q&A

Q1: 为什么提取组织或细胞时 RNA Spin Column 会出现堵塞现象?

A1: 如果使用该试剂盒出现 RNA Spin Column 堵塞现象, 原因可能有以下几种:

- ① 样品裂解不充分。样品裂解不充分会导致 RNA Spin Column 的堵塞。关于组织或细胞的裂解请参见操作方法中的组织或细胞的裂解。难裂解的组织建议使用液氮研磨的方法进行裂解。
- ② 样品起始量过多。样品量过多会造成核酸量过多而发生堵塞现象。使用该试剂盒提取的组织或细胞的适宜起始量, 请参考“不同组织的适宜起始量和裂解 Buffer RL 使用量”。
- ③ 离心温度过低。使用该试剂盒进行 RNA 提取时, 如无特殊说明均在室温 (20~25℃) 下进行。温度过高或过低都会对 RNA Spin Column 造成影响, 发生堵塞现象。

Q2: 为什么提取组织或细胞时 gDNA Eraser Spin Column 会出现堵塞现象?

A2: 对于基因组含量较高或者样品起始量较大时, 请不要使用 gDNA Eraser Spin Column, 以免 gDNA Eraser Spin Column 发生堵塞。如果样品量较少或基因组含量较少也发生堵塞现象, 则可能的原因是:

- ① 样品裂解不充分。样品裂解不充分会导致 Column 的堵塞。关于组织或细胞的裂解请参见操作方法中的组织或细胞的裂解。难裂解的组织建议使用液氮研磨的方法进行裂解。
- ② 样品起始量过多。样品量过多会造成核酸量过多而发生堵塞现象。使用该试剂盒提取的组织或细胞的适宜起始量, 请参考“不同组织的适宜起始量和裂解 Buffer RL 使用量”。
- ③ 离心温度过低。使用该试剂盒进行 RNA 提取时, 如无特殊说明均在室温 (20~25℃) 下进行。
- ④ 离心转数过低。如发生堵塞的现象, 可以加大离心转数以及离心时间。

Q3: 如果 gDNA Eraser Spin Column 发生堵塞怎么办?

A3: 如果 gDNA Eraser Spin Column 发生堵塞, 则:

- ① 将样品吸出后直接进行后续实验。
- ② 增加离心次数和时间。
- ③ 增大离心转数。
- ④ 如果是基因组较多或起始量较大, 不要进行 gDNA Eraser Spin Column 的过滤。

Q4: 为什么 RNA 收量过低?

A4: 使用该试剂盒提取的组织或细胞的收量请参考“不同组织的 RNA 提取量”。如果 RNA 的收量过低, 则可能有以下几种原因:

- ① 样品裂解不充分。样品的充分裂解是使用该试剂盒提取高质量 RNA 的关键。关于样品的裂解请参考操作方法中的组织或细胞的裂解。
- ② 样品起始量过多。使用该试剂盒提取的组织或细胞的适宜起始量, 请参考“不同组织的适宜起始量和裂解 Buffer RL 使用量”。
- ③ RNA 洗脱不充分。建议重复洗脱 RNA 一次。洗脱时可以将 RNase Free dH₂O 或 0.1% DEPC dH₂O 在 RNA Spin Column 中的静置时间延长至 10 分钟。
- ④ 洗脱液中有乙醇残留。在使用 Buffer RWB 进行 RNA Spin Column 清洗后没有进行后续的离心过程, 造成乙醇残留, 使 RNA 的收量下降。建议在使用 Buffer RWB 清洗后再进行一次离心, 以去除残留的乙醇。

Q5: 为什么 RNA 发生降解?

A5: 如果提取时发生降解, 则可能有以下几种原因:

- ① 使用的组织材料不够新鲜。应使用新鲜的组织材料, 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 时使用的试剂及器具中混有 RNA 分解酶。实验前请参考“预防 RNase 污染的注意事项”，以避免 RNase 污染。
- ③ 提取的组织材料中含有大量 RNA 分解酶。RNA 分解酶较多的组织或细胞应当减少样品起始量，并加大 Buffer RL 用量。

Q6: 提取的 RNA 中含有基因组 DNA，怎么办？

A6: 本试剂盒提供了去除基因组 DNA 的 gDNA Eraser Spin Column，能够很好地去掉材料中的基因组 DNA，很少含有基因组 DNA 的污染。如果提取的 RNA 中含有基因组 DNA 污染，则可能有以下几种原因：

- ① 样品裂解不充分。样品不充分裂解会造成基因组 DNA 的残留。样品的裂解方法请参考操作方法中的组织或细胞的裂解。
- ② 样品起始量过多。过多的起始量使得核酸含量过多，超过 gDNA Eraser Spin Column 的承载量，造成基因组 DNA 残留。请参考“不同组织的适宜起始量和裂解 Buffer RL 使用量”。
- ③ 样品的基因组 DNA 含量过高。不同组织中基因组 DNA 的含量不同，对于基因组 DNA 含量较高的样品，请减少样品起始量，并增加提取时 Buffer RL 的用量。
- ④ 未进行 DNase I 的消化处理。对于部分基因组 DNA 含量较高的组织材料或后续实验对 RNA 纯度要求比较严格，则需进行 DNase I 的消化处理。请参考操作方法，进行 DNase I 的消化处理。

Q7: RNA 的吸光度代表的含义是什么？

A7: 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 1.8~2.0 之间，当 R<1.8 时，溶液中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。

Q8: RNA 的浓度怎样计算？

A8: RNA 的浓度可以根据吸光度进行计算：

RNA 浓度 = (OD₂₆₀ - OD₃₂₀) × 稀释倍数 × 0.04 μg/μl。

Q9: 使用本试剂盒提取小分子 RNA，提取效果如何？

A9: 使用本试剂盒能够有效提取分子量大于 200 nt 的 RNA。对于分子量小于 200 nt 的 RNA，使用本试剂盒不能很好地提取。

Q10: 使用本试剂盒提取基因组 DNA，效果如何？

A10: 本试剂盒只能进行简单的基因组 DNA 提取。基因组 DNA 的收量相对较低，可以进行简单的 PCR 扩增。当材料的基因组 DNA 不易提取、基因组 DNA 含量较低或者后续实验对基因组 DNA 要求较高时，请选用 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0 (Code No. 9765) 进行提取，本试剂盒不承诺提取效果。

Q11: 裂解组织时，是否可以采用液氮研磨以外的裂解方式？

A11: 裂解组织时，可以根据不同组织材料采取不同的裂解方式，如液氮研磨、组织匀浆器、组织破碎仪 (NEXT ADVANCE BBX24B)、电动研磨器 BioMasher (nippi)、一次性组织研磨杵等。一般的动物组织，如肝脏、胰脏、脑等易于破碎的材料，使用本试剂盒，经验证上述方法均适用，且 RNA 的收量及纯度差别不明显；但对于植物组织及肌肉等富含纤维的组织材料，仍建议客户使用液氮研磨等较为剧烈、充分的破碎方法，以保证组织材料的充分裂解；当组织材料量较少（不易获得）时，建议客户使用组织破碎仪 (NEXT ADVANCE BBX24B)、电动研磨器 BioMasher (nippi) 或一次性组织研磨杵等在裂解过程中不易丢失组织材料的裂解方法。

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>