

版本号: DP141010

RNAPrep Pure Cell/Bacteria Kit

RNAPrep Pure培养细胞/细菌

总RNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP430

产品内容

产品组成	DP430 (50 preps)
裂解液RL(Buffer RL)	30 ml
去蛋白液RW1(Buffer RW1)	40 ml
漂洗液RW(Buffer RW)	12 ml
RNase-Free ddH ₂ O (瓶装)	15 ml
RNase-Free吸附柱CR3 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR3 in a 2 ml Collection Tube)	50 套
RNase-Free过滤柱CS (含2 ml收集管) (RNase-Free Filtration Column CS in a 2 ml Collection Tube)	50 套
DNase I(1500 U)	1 支
缓冲液RDD(Buffer RDD)	4 ml
RNase-Free ddH ₂ O (管装)	1 ml
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5 ml)	50 个

选配试剂

溶菌酶（RT401，客户自备，提取细菌总RNA时需配备。）

储存条件

RNase-Free DNase I, 缓冲液RDD和RNase-Free ddH₂O(管装)置于2-8℃保存；加入β-巯基乙醇的裂解液RL 4℃可放置一个月；其他试剂室温保存。

产品简介

本试剂盒可从培养的动物细胞或者细菌中快速提取总RNA，可同时处理大量不同样品。30-40 min内即可完成反应，提取的总RNA纯度较高，基本没有DNA和蛋白质污染，可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在裂解液RL中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4 h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用无RNase的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(V/V)，放置过夜，高压灭菌。）

不同种细胞的最大用量及RNA得率：

细胞种类	最大用量	最大用量时RNA得率
COS	3×10^6	多至35 μg
Hela	7×10^6	多至15 μg
NIH/3T3	1×10^7	多至10 μg

使用前注意事项

1. 操作前在RL中加入 β -巯基乙醇至终浓度为1%，如1 ml RL中加入10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RL 4 $^{\circ}$ C可放置一个月，裂解液RL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
2. 第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
3. 以下操作如非指明，均在室温下进行。

DNase I储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550 μ l RNase-Free ddH₂O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。

注意：从-20 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。

一. 从培养细胞中提取总RNA

1. 收集细胞：

悬浮细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 1×10^7 ）：估计细胞数量，300 \times g离心5 min，将细胞收集到离心管中，仔细吸除所有培养基上清。

单层贴壁细胞的收集（收集细胞数量请不要超过 1×10^7 ）：可直接在培养容器中裂解（容器直径不超过10 cm），或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀。（在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法。）

- 1) 直接裂解法：确定细胞数量，彻底吸除细胞培养基上清，立即进行第2步裂解步骤。
- 2) 胰蛋白酶处理法：确定细胞数量，吸除培养基，用PBS洗涤细胞，吸除PBS，向细胞中加入含有0.10-0.25%胰蛋白酶的PBS处理细胞，当细胞脱离容器壁时，加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶，将细胞溶液转移至RNase-Free的离心管中，300 \times g离心5 min，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清。

注意：收集细胞时一定要将细胞培养基去除干净，否则会导致裂解不完全，影响RNA与吸附柱的结合，造成RNA的产量降低。

2. 裂解处理

对于离心得到的细胞沉淀：轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加入适量裂解液RL（见下表，使用前请先检查是否已加入 β -巯基乙醇），旋涡震荡。

沉淀细胞数量	裂解液RL (μ l)
$<5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

对于直接裂解的细胞：RL（见下表，使用前请先检查是否已加入 β -巯基乙醇），将细胞裂解液转移至离心管中，涡旋震荡混匀。

容器直径 (cm)	裂解液RL (μ l)
<6	350
6-10	600

3. 将所有溶液转移至过滤柱CS上(过滤柱CS放在收集管中)，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min，收集滤液。
4. 向滤液中加入1倍体积70%乙醇（通常为350 μ l或600 μ l），混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中（吸附柱CR3放入收集管中），12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。
注意：配制70%乙醇时请使用RNase-Free ddH₂O，如果滤液体积有所损失，请相应减少70%乙醇用量。将溶液和沉淀转移至吸附柱CR3时，如果体积大于吸附柱容量，可以分两次完成。
5. 向吸附柱CR3中加入350 μ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。
6. DNase I 工作液的配制：取10 μ l DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70 μ l RDD溶液，轻柔混匀。
7. 向吸附柱CR3中央加入80 μ l的DNase I 工作液，室温放置15 min。
8. 向吸附柱CR3中加入350 μ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

9. 向吸附柱CR3中加入500 μl 漂洗液RW (使用前请先检查是否已加入乙醇)，室温静置2 min，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

10. 重复步骤9。

11. 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CR3在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验。

12. 将吸附柱CR3转入一个新的RNase-Free离心管中，加入30-100 μl RNase-Free ddH₂O室温放置2 min，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min，得到RNA溶液。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于30 μl ，体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

二 从细菌中提取总RNA

1. 4℃ 12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min收集菌体（收集菌体的最大量不超过 1×10^9 ），仔细去除所有培养基上清，以后的所有离心步骤均在室温（20-25℃）进行。

注：如果培养基上清去除不完全，将对第二步中的细胞壁消化过程产生抑制。

2. 用含有溶菌酶的100 μl TE缓冲液（客户自己配制，配制方法见下表）彻底重悬菌体，孵育时间见下表。

	TE缓冲液中的溶菌酶终浓度	孵育时间（室温）
G-细菌	400 μg/ ml	3-5 min
G+细菌	3 mg/ ml	5-10 min

3. 加入350 μl裂解液RL（在使用前请加入β-巯基乙醇），涡旋振荡混匀，若出现不溶性沉淀，12000 rpm(~13,400×g)离心2 min，将上清转移至另一离心管中。
4. 加入250 μl无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中（吸附柱放在收集管中），12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉废液，将吸附柱CR3放回收集管中。
5. 向吸附柱CR3中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. DNase I 工作液的配制：取10 μl DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀。
7. 向吸附柱CR3中央加入80 μl的DNase I 工作液，室温放置15 min。
8. 向吸附柱CR3中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
9. 向吸附柱CR3中加入500 μl漂洗液RW（使用前请先检查是否已加入乙醇），室温放置2 min，12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

10. 重复步骤9。

11. 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：此步骤目的是将吸附柱CR3中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的RT等实验。

12. 将吸附柱CR3转入一个新的RNase-Free离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100 μ l RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min，得到RNA溶液。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于30 μ l，体积过小影响回收效率。RNA溶液请在-70 $^{\circ}$ C保存。

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品