培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒

（离心柱型）
目录号：GF430

产品内容

产品组成	GF430 / (50 preps)
裂解液 RL (Buffer RL)	30 ml(使用前加入 300ul 的巯基乙醇)
溶液 RW (Buffer RW)	55 ml
DNase I (4U/10ul)	600 ul
DNA 消化缓冲液 (Buffer RDD)	5 ml
漂洗液 PW (Buffer PW)	16 ml（使用前请先加入 64ml 无水乙醇）
无酶双蒸水(RNase-Free ddH2O)	45 ml
无酶离心管(RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5ml)	50 个
无酶过滤柱 CS1 (Filtration Columns CS1)	50 套
无酶吸附柱 CR1 (Spin Columns CR1)	50 套

选配的试剂

溶菌酶（50mg/ml）目录号：GF0203-01，客户自备，提取细菌总 RNA 时需配备

储存条件

DNase I（为DNase I 冻干粉溶解于专用保存液），储存于-20℃；
其他试剂室温（15-25℃）保存。

产品简介

培养细胞/细菌总RNA提取试剂盒，提供了快速简单且有效的方法，可从培养细胞和细菌中提取总RNA。本试剂盒采用离心管柱的方式，配合使用我司独特的硫氰酸胍裂解液，使细胞或细菌裂解及均质化，并加入乙醇使RNA选择性的与管柱膜结合，于操作过程中加入DNase Ⅰ以去除残留的基因组DNA，经过多次“洗涤及离心”的步骤去除污染杂质，再以无核酸酶水回收结合在管柱膜上的RNA。若RNA小于200nt，如5sRNA、tRNA和microRNA,无法在此系统中被有效地回收。提取的总RNA纯度高，基本没有DNA和蛋白质污染，可用于PCR、芯片分析、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4h，塑料器皿可在0.5M NaOH中浸泡10min，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)，高压灭菌）。

使用前注意事项

1. 裂解液 RL：使用前请添加 300ul 巯基乙醇，**添加过巯基乙醇的裂解液 4℃保存**。
2. 漂洗液 PW：使用前请添加 64ml 无水乙醇。
3. 为确保 RNA 的品质及产量，应尽量收取新鲜的动物组织进行 RNA 提取，或将组织立即以液氮冷冻，储存于-70℃，组织亦可保存在 RANstore 样本保存液（目录号：TR38）中。样本保存在 RNAstore 试剂中，可于 37℃存放 1 天、4℃存放 1 个月、-20℃永久保存，所提取的 RNA 品质与储存在液氮中相同。

操作步骤

一、从培养细胞中提取总 RNA

1. 收集细胞

a. 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×g 离心 5min，将细胞收集到离心管中，仔细吸除所有培养基上清。

b. 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 10cm），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。）

- 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。
- 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×g 离心 5min，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液去除干净，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;请勿使用过多的样本量，避免管柱杜塞而造成 RNA 的产量降低。

2. 裂解处理

a. 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（**详见下表，使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇**），旋涡震荡混匀。

沉淀细胞数量	裂解液 RL(ul)
$<5\times10^6$	350
5×10^6-1×10^7	600

b. 对于直接裂解的细胞：加入适量裂解液 RL（**详见下表，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(ul)
<6	350
6-10	600

3. 将所有溶液转移至过滤柱 CS1 上(过滤柱 CS1 放在收集管中)，12,000rpm(~13,400×g)离心 2min，收集滤液。
4. 向滤液加入等体积 70%乙醇至裂解液中，混匀（此时可能会出现沉淀）。
5. 将“裂解液/乙醇混合液”(含沉淀)移取至吸附柱 CR1 中(吸附柱 CR1 放入收集管中)，12,000rpm(~13,400×g)离心 30-60sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

注意：将溶液和沉淀转移至吸附柱 CR1 时，如果体积大于吸附柱容量，可以分次完成。

6. 向吸附柱 CR1 加入 500ul 溶液 RW，12,000rpm(~13,400×g)离心离心 1min，丢弃滤液。

7. DNase Ⅰ降解。

每一纯化反应，请将 80ul DNA 消化液（Buffer RDD）与 10ul DNase Ⅰ 预先混合在新的离心管(轻弹或翻转离心管以混合均匀，请勿震荡)，将 90ul“DNase Ⅰ 工作液”加入至吸附柱的膜中心，于室温（25-28℃）孵育 15 分钟。

注意：如同时操作多组样本，请使用前现配新鲜的 DNase Ⅰ工作液,请勿预先配制保存 DNase Ⅰ工作液。

8. 向吸附柱 CR1 中加入 500ul 溶液 RW，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

9. 向吸附柱 CR1 中加入 600ul 漂洗液 PW**（使用前请先检查是否已加入乙醇）**，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

10. 重复操作步骤 9。

11. 12,000rpm(~13,400×g)离心 3min，将吸附柱 CR1 置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的乙醇。

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 CR1 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 CR1 转入一个新的 RNase-Free 离心管中，加入 30-100 ul 无酶双蒸水至吸附柱的膜中心，室温静置 2min，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，得到 RNA 溶液。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 30ul，体积过小影响回收效率；RNA 溶液请于-70℃保存。

二、从细菌中提取总 RNA

1. 4℃ 12,000rpm(~13,400×g)离心 2min 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。

注意：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 100ul 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	400ug/ml	3-5min
G+细菌	3mg/ml	5-10min

3. 加入 350ul 裂解液 RL**（使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇）**，涡旋振荡混匀。

4. 将裂解混合液转移至过滤柱 CS1 上(过滤柱 CS1 放入收集管)，12,000rpm(~13,400×g)离心 2min，收集滤液。

5. 向滤液中加入 250ul 无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。

6. 将“裂解液/乙醇混合液”(含沉淀)移取至吸附柱 CR1 中(吸附柱 CR1 放入收集管中)，12,000rpm(~13,400×g)离心 30-60sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

注意：将溶液和沉淀转移至吸附柱 CR1 时，如果体积大于吸附柱容量，可以分次完成。

7. 向吸附柱 CR1 中加入 500ul 溶液 RW，12,000rpm(~13,400×g)离心离心 1min，丢弃滤液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

8. DNase Ⅰ降解。

每一纯化反应，请将 80ul DNA 消化液（Buffer RDD）与 10ul DNase Ⅰ 预先混合在新的离心管(轻弹或翻转离心管以混合均匀，请勿震荡)，将 90ul“DNase Ⅰ 工作液”加入至吸附柱的膜中心，于室温（25-28℃）孵育 15 分钟。

注意：如同时操作多组样本，请使用前现配新鲜的 DNase Ⅰ工作液,请勿预先配制保存 DNase Ⅰ工作液。

9. 向吸附柱 CR1 中加入 500ul 溶液 RW，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。
10. 向吸附柱 CR1 中加入 600ul 漂洗液 PW**（使用前请先检查是否已加入乙醇）**，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。
11. 重复操作步骤 10。
12. 12,000rpm(~13,400×g)离心 3min，将吸附柱 CR1 置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的乙醇。

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 CR1 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。

13. 将吸附柱 CR1 转入一个新的 RNase-Free 离心管中，加入 30-100ul 无酶双蒸水至吸附柱的膜中心，室温静置 2min，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，得到 RNA 溶液。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 30ul，体积过小影响回收效率；RNA 溶液请于-70℃保存。