

# 细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒

## 产品组分

组分	R1061 (50 次)
溶液 RD	30 ml
溶液 RB	50 ml
溶液 RP	30 ml
溶液 RW	12 ml
TE	1 ml × 2
DEPC 处理水	10 ml
溶菌酶 (50 mg/ml)	500 μl
RNase-free 纯化柱	50 个
RNase-free 离心管	50 个
说明书	1 份

## 产品说明

细胞/细菌RNA提取试剂盒是经过改进开发的新一代产品,提高了裂解液的裂解能力和提取的灵敏度,同时通过可在特定适宜的条件下特异、可逆地结合RNA,而各种蛋白质和其他杂质均可被去除掉对硅基质膜的改进增强了对RNA的吸附能力,得到的RNA纯度更好,质量更高。该试剂盒可从各种培养细胞或菌体中快速提取总RNA,每个吸附柱每次可处理50–100 mg 组织或 $5 \times 10^6$  细胞,可同时处理大量不同样品。一个小时内即可完成反应,提取的总RNA 没有DNA 和蛋白的污染,可用于Northern blot、Dot blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆。

## 保存条件

溶菌酶-20℃保存,其他试剂盒组分 4℃保存。

## 需要自备的溶液

- β-巯基乙醇
- 无水乙醇

## 注意事项

- 操作前在溶液 RD中加入β-巯基乙醇至终浓度为1%,如1 ml RD 中加入10 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的溶液 RD 4℃可放置一个月,溶液 RD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。
- 第一次使用前应在溶液 RW中加入无水乙醇,加入量为溶液RW: 无水乙醇=1: 4,即每12 ml溶液RW需要加入48 ml无水乙醇。
- 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的 RNase 污染。操作过程中勤换手套。
- 使用本产品提取的 RNA 一般不含有 DNA 污染。在极少数情况下(与组织 pH 值等相关),如果有 DNA 污染而又必须去除,则可以用 RNase-free 的 DNase 处理样品。
- 请严格遵照操作步骤操作。
- 不同起始材料试剂用量及预期 RNA 产率。

细胞种类	做大用量	最大用量时 RNA 得率
COS	$3 \times 10^6$	35 μg
Hela	$7 \times 10^6$	15 μg
NIH/3T3	$1 \times 10^7$	10 μg

**操作步骤**

操作前在**溶液 RD**中加入β-巯基乙醇至终浓度为1%

第一次使用前应在**溶液 RW**中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。

**1 收集细胞**

**悬浮细胞的收集**（收集细胞数量请不要超过 $1 \times 10^7$ ）：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 $1 \times 10^7$ ）：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。

**菌体的收集**（收集菌体的最大量不超过 $1 \times 10^9$ ）： $4^\circ\text{C}$  12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min收集菌体，仔细去除所有培养基上清，用含有溶菌酶的100  $\mu\text{I}$ TE彻底重悬菌体，孵育时间见下表。

	TE缓冲液中溶菌酶的浓度	孵育时间（室温）
G <sup>-</sup> 细菌	400 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3-5 min
G <sup>+</sup> 细菌	3 $\text{mg}/\text{ml}$	5-10 min

**以后的所有离心步骤均在室温（20-25 $^\circ\text{C}$ ）进行。**

2. 加入350  $\mu\text{l}$ **溶液 RD**（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( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min，将上清转移至另一离心管中。

3. 加入700  $\mu\text{l}$ **溶液 RB**，混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入**纯化柱**（纯化柱+收集管）中，12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心30-60 s，倒掉废液，将纯化柱放回收集管中。

4. 向**纯化柱**中加入350  $\mu\text{l}$ **溶液 RP**，12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心30-60 s，弃废液，将**纯化柱**放回收集管中。

5. 向**纯化柱**中加入500  $\mu\text{l}$  **溶液 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 s，弃废液，将**纯化柱**放回收集管中。

6. 向**纯化柱** 中加入500  $\mu\text{l}$  **溶液 RW**，室温静置2 分钟，12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心30 s，弃废液，将**纯化柱**放回收集管中。

7. 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min，去除残余液体，将**纯化柱**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：此步骤目的是将纯化柱中残余的漂洗液去除，离心后将纯化柱在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的**RT**等实验操作。

8. 将**纯化柱**转入一个新的离心管中，加30–100  $\mu\text{l}$  **RNase-free ddH<sub>2</sub>O**，室温放置2 min，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于**30  $\mu\text{l}$** ，体积小影响回收效率。且**RNA**应保存在**-70 $^\circ\text{C}$** ，以防降解。

注意：如果想提高**RNA**得率，可重复上步操作一次，合并两次得到的溶液。