

版本号: FRI1830

FinePure Cell/Bacteria RNA Kit

FinePure 培养细胞/细菌 RNA 提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: FR202

产品内容:

Contents	FR202 (50 preps)
DNase I (2,000 U)	1 瓶
DNase I Buffer	4 ml
RNase Free ddH ₂ O (管装)	1 ml
Buffer RLT	30 ml
Buffer RW	40 ml
Buffer RW2	12 ml
RNase Free ddH ₂ O	15 ml
RNAPure Spin Columns	50 个
FinePure Filtration Columns	50 个
2 ml Collection Tubes	2×50 个
1.5 ml RNase Free Microcentrifuge Tubes	50 个
说明书	1 份

储存条件:

本试剂盒中的 DNase I 组分采用冰袋运输, 收到后立即将 DNase I 置于 2-8°C 保存, 其他试剂室温(15-25°C)保存。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品简介：

本试剂盒采用了独特的缓冲液系统，无需使用 β -巯基乙醇等有毒有害试剂，适合从动物细胞或者细菌中提取总RNA。使用本试剂盒可以有效提取分子量大于 200 nt 的 RNA。本试剂盒具有高效、快速、方便的特点，提取过程中也无需苯酚氯仿抽提等步骤。利用该试剂盒提取的RNA纯度高，极少含蛋白质、基因组DNA 和其它杂质的污染。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。

注意事项：

1. 尽可能使用新鲜收集的样品，RNA 产量与起始样品中 RNA 的完整性有关，按照说明书标准流程降解为小片段的 RNA 不能被有效回收。
2. 第一次使用前应在漂洗液 RW2 中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
3. 如需提取包含 Small RNA (<200 nt)的 RNA，可以联系 GENFINE 获得相应的提取流程。

DNase I母液的配制：

先用 1 ml 注射器吸取 550 μ l RNase Free ddH₂O，然后打进装有 DNase I 干粉 (2,000 U) 的玻璃瓶中，轻柔混匀，分装后 -20 $^{\circ}$ C 贮存 (可保存 9 个月)。(如果需要另外购买 DNase I, 目录号: RA102-01)。

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

操作步骤：

一、从培养细胞中提取总 RNA

1. 匀浆处理
 - a) 贴壁细胞：彻底吸弃培养液，每6-10 cm²面积加入 600 μ l Buffer RLT，用移液器吹打3-5次使细胞裂解。
 - b) 细胞悬液：500 x g 离心收集细胞，每 5×10^6 - 1×10^7 细胞加入 600 μ l Buffer RLT，少于 5×10^6 细胞加入 350 μ l Buffer RLT，用移液器吹打3-5次使细胞裂解。
2. 将所有溶液转移至过滤柱FinePure Filtration Column (过滤柱放在收集管中)，12,000 rpm离心 2 min，小心吸取收集管中的滤液至新的 1.5 ml RNase Free离心管中，吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。

3. 缓慢加入 0.5 倍滤液体积的无水乙醇，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 RNAPure Spin Columns (吸附柱放在收集管中)，12,000 rpm离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
4. 向吸附柱中加入 350 μ l Buffer RW，12,000 rpm离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
5. DNase I 工作液的配制：取 10 μ l DNase I 母液放入新的 RNase Free离心管中，加入 70 μ l DNase I Buffer，轻柔混匀。（DNase I 母液的配制：将 DNase I 干粉（2,000 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：解冻后的 DNase I母液保存于 4 $^{\circ}$ C（可保存 6 周），避免反复冻融。**
6. 向吸附柱中央加入 80 μ l 的DNase I 工作液，室温放置15 min。
7. 向吸附柱中加入 350 μ l Buffer RW，12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
8. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer RW2（使用前请先检查是否已加入乙醇），12,000 rpm离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
9. 重复操作步骤 8一次。
10. 12,000 rpm 离心 3 min，将吸附柱放入一个新的 1.5 ml RNase Free离心管中，向吸附膜中央加入 50-100 μ l RNase Free ddH₂O，室温放置1 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液。

二、从细菌中提取总 RNA

1. 4 $^{\circ}$ C 12,000 rpm 离心 2 min 收集菌体（菌体量请不要超过 1×10^9 ），小心去除所有培养基上清。

注意：上清一定要去除干净，否则将导致 RNA 得率和质量下降。

2. 用含有 Lysozyme 的 100 μ l TB 缓冲液彻底重悬菌体，室温孵育。Lysozyme 使用量及孵育时间见下表。

细菌种类	TB 缓冲液中 Lysozyme 终浓度	孵育时间
G-细菌	400 μ g/ml	3-5 min
G+细菌	3 mg/ml	5-10 min

3. 加入 350 μ l Buffer RLT，涡旋震荡混匀（此步骤可能出现沉淀），振荡混匀，若出现不溶性沉淀，12,000 rpm 离心 2 min，将上清转移至另一离心管中。

-
4. 缓慢加入 0.5 倍滤液体积的无水乙醇，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 RNAPure Spin Columns (吸附柱放在收集管中)，12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
 5. 向吸附柱中加入 350 μ l Buffer RW，12,000 rpm 离心30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
 6. DNase I 工作液的配制：取 10 μ l DNase I 母液放入新的 RNase Free 离心管中，加入 70 μ l DNase I Buffer，轻柔混匀。(DNase I母液的配制：将 DNase I干粉 (2,000 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：解冻后的 DNase I母液保存于4 $^{\circ}$ C（可保存6周），避免反复冻融。**
 7. 向吸附柱中央加入 80 μ l的 DNase I 工作液，室温放置15 min。
 8. 向吸附柱中加入 350 μ l Buffer RW，12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
 9. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer RW2（**使用前请先检查是否已加入乙醇**），12,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
 10. 重复操作步骤 9 一次。
 11. 12,000 rpm 离心 3 min，将吸附柱放入一个新的 1.5 ml RNase Free 离心管中，向吸附膜中央加入 50-100 μ l RNase Free ddH₂O，室温放置1 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液。