

Cell/Bacterial Total RNA Extraction Kit

培养细胞/细菌总RNA提取试剂盒 (离心柱型)

目录号

RE716

产品组成

组分	规格 (50 次)
裂解液 GBRL (Buffer GBRL)	30 mL
去蛋白液 GRW1 (Buffer GRW1)	40 mL
漂洗液 GPW2 (Buffer GPW2)	12 mL
无 RNA 酶双蒸水 (RNase-Free ddH ₂ O)	15 mL
RNase-Free DNase I	100 μ L
DNase Buffer	1.5 mL
RNase-Free FlaPure gDNA Remove Columns	50 套
RNase-Free FlaPure RNA Columns	50 套

保存条件

本试剂盒中 RNase-Free DNase I 和 DNase Buffer 置于-20 °C保存, 其余组分常温 (10~25°C) 保存 12 个月。

产品简介

本产品适合于从培养的动物细胞或者细菌中快速提取总 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术, 提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提, 整个提取过程只需 30~40 min。试剂盒采用膜过滤及 DNase I 消化, 可更高效地去除基因组 DNA, 提取的总 RNA 纯度高, 没有蛋白和其他杂质的污染, 可直接用于 RT-PCR、Northern Blot、Poly A 纯化、核酸保护和体外翻译等实验。

产品特点

- ◇ 安全低毒: 无需酚、氯仿等有毒试剂;
- ◇ 操作简便: 30~40 min 内完成数个样品的总 RNA 提取;
- ◇ 高效去除基因组 DNA: 采用膜过滤及 DNase I 消化, 高效去除基因组 DNA;

本产品仅供科研使用

◇ RNA 纯度高：提取的 RNA 无杂质残留，适用于对纯度、完整性要求很高的下游实验。

适用范围

本产品适用于培养细胞/细菌的总 RNA 提取。

注意事项

1. 第一次使用前应在漂洗液 GPW2 中加入 48 mL 的无水乙醇。
2. 操作前在裂解液 Buffer GBRL 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 mL GBRL 中加入 10 μ L β -巯基乙醇。此裂解液现配现用，加过 β -巯基乙醇的 GBRL 置于 2~8°C 可保存一个月。裂解液 GBRL 在储存时可能会形成沉淀，若有沉淀出现，请加热溶解后使用。
3. DNase I 工作液的配制：2 μ L DNase I + 28 μ L DNase Buffer，轻轻吹打混匀，现用现配。
4. 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染，经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌、汗液及 RNase 等，可能导致 RNA 降解。
5. RNA 在裂解液 GBRL 中不会被 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°C 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、灭菌。
6. 以下操作无明确指明，均在室温下进行。

使用方法

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，仔细去除所有的培养基上清；
 - b. 单层贴壁细胞的收集（收集细胞数量不要超过 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，吸除培养基上清，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，收集细胞沉淀中，仔细去除所有的上清。

注意：培养基上清去除不干净，将会导致裂解不充分，影响 RNA 与吸附柱的结合，造成 RNA 产量降低。

2. 裂解处理：

本产品仅供科研使用

- 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，加入适量的裂解液 GBRL (详情见下表，使用前请先检查是否已加入 β -巯基乙醇)，涡旋震荡混匀；

沉淀细胞数量	裂解液 GBRL (μ L)
$< 5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	600

- b. 对于直接裂解的细胞：加入适量的裂解液 GBRL (详情见下表，使用前请先检查是否已加入 β -巯基乙醇)，将细胞裂解液转移到离心管中，涡旋震荡混匀；

容器直径 (cm)	裂解液 GBRL (μ L)
< 6	350
$6 \sim 10$	600

- 将所有溶液转移至过滤柱 RNase-Free FlaPure gDNA Remove Columns 中，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 2 min，收集滤液；
- 向滤液中加入 1 倍体积的 70%无水乙醇 (通常为 350 μ L 或 600 μ L)，充分混匀 (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 RNase-Free FlaPure RNA Column 中，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 30~60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中；

注意：配制 70%无水乙醇时请使用 RNase-Free ddH₂O，如果滤液体积有损失，请相应调整乙醇的用量。

- 向吸附柱中加入 350 μ L 去蛋白液 GRW1，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 30~60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中；
- DNase I 工作液配制：2 μ L DNase I + 28 μ L DNase Buffer，轻轻吹打混匀；
- 向吸附柱中央加入 30 μ L 的 DNase I 工作液，室温放置 15 min；
- 向吸附柱中加入 350 μ L 去蛋白液 GRW1，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 30~60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中；
- 向吸附柱中加入 500 μ L 漂洗液 GPW2 (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 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中；
- 重复步骤 9；
- 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 2 min，倒掉废液。将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液；

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

- 将吸附柱放入一个新的 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(~13,400×g)离心 2 min, 得到 RNA 溶液, 将洗脱的 RNA 置于-80 °C保存。(洗脱液体积小影响回收效率,柱子最小的洗脱体积是 30 μL。)

二、从细菌中提取总 RNA

1. 4°C 12,000 rpm(~13,400×g) 离心 2 min 收集菌体 (收集的菌体最大量不超过 1×10^9), 仔细去除所有的培养基上清, 后续所有离心步骤均在室温下 (20~25°C) 进行;

注意: 如果培养基上清去除不干净, 将会对第二步中的细胞壁消化产生抑制。

2. 用含有溶菌酶的 100 μL 的 TE 缓冲液 (客户自己配制) 彻底重悬菌体, 孵育时间见下表;

	TE 缓冲液中溶菌酶的终浓度	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 的裂解液 GBRL (**使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇**), 涡旋震荡混匀;
(**可选步骤:** 若出现不溶性沉淀, 可在步骤 4 前先将样品于 12,000 rpm(~13,400×g) 离心 2 min, 取上清再进行步骤 4 过滤。)
4. 将所有溶液转移至过滤柱 RNase-Free FlaPure gDNA Remove Columns 中, 12,000 rpm(~13,400×g) 离心 2 min, 收集滤液;
5. 加入 250 μL 的无水乙醇, 充分混匀 (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 RNase-Free FlaPure RNA Column 中, 12,000 rpm(~13,400×g)离心 30~60 s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中;
6. 向吸附柱中加入 350 μL 去蛋白液 GRW1, 12,000 rpm(~13,400×g)离心 30~60 s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中;
7. DNase I 工作液配制: 2 μL DNase I+28 μL DNase Buffer, 轻轻吹打混匀;
8. 向吸附柱中央加入 30 μL 的 DNase I 工作液, 室温放置 15 min;
9. 向吸附柱中加入 350 μL 去蛋白液 GRW1, 12,000 rpm(~13,400×g)离心 30~60 s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中;
10. 向吸附柱中加入 500 μL 漂洗液 GPW2 (**使用前请先检查是否已加入乙醇**), 室温静置 2 min, 12,000 rpm(~13,400×g)离心 30~60 s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中;
11. 重复步骤 10;
12. 12,000 rpm(~13,400×g)离心 2 min, 倒掉废液。将吸附柱置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液;

本产品仅供科研使用

注意：此步骤目的是将吸附柱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。

13. 将吸附柱放入一个新的 RNase-Free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 30~100 μL RNase-Free ddH₂O，室温放置 2 min，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 2 min，得到 RNA 溶液，将洗脱的 RNA 置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。(洗脱液体积过小影响回收效率，柱子最小的洗脱体积是 30 μL 。)

常见问题与解决办法

Q1: 提取的 RNA 出现降解?

A2:

- 1) 样品用量过多。影响裂解液的裂解能力，造成 RNase 未被充分抑制，导致 RNA 降解，建议参考说明书推荐取样量，若要增加样品起始量，则后续实验中各溶液量均要按等比例增加。对于内源 RNase 含量较多的组织应减少样品量，适当增加裂解液用量；
- 2) 操作过程中引入 RNase 污染。请使用 RNase-Free 的工具、试剂和耗材；
- 3) 电泳过程中发生降解。使用 RNase-Free 的 Loading Buffer、琼脂糖和电泳缓冲液等。

Q2: RNA 得率低?

A3:

- 1) 样品用量过多。样品过量会影响裂解效果，建议按照说明书要求适量取样；
- 2) 样品裂解不充分。请按照说明书的要求进行充分裂解；
- 3) 洗脱不充分。RNase-Free ddH₂O 需直接加到膜中央，并静置 2 min 后再离心，必要时可进行二次洗脱以提高产量；
- 4) 吸附柱有乙醇残留。使用 Buffer GPW2 漂洗后需要开盖晾干吸附柱中的乙醇。

Q3: 提取的 RNA 中有 DNA 污染?

A4:

- 1) 样品用量过多。超出试剂盒规定的样本量影响裂解液的裂解能力可能会导致基因组的污染；
- 2) 次生代谢物较多。次生代谢物含量高的样本在提取 RNA 时易出现基因组的污染；
- 3) 操作过程中需要进行去除基因组 DNA 的操作，若 DNA 含量较多，可延长 DNase I 消化时间或重复消化。