

RNAPrep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒

RNAPrep Pure Cell/Bacteria Kit



产品详情

产品货号	产品名称	储存条件	保质期
SM0272	RNAPrep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒	2-8℃	15 个月

选配试剂：

溶菌酶

储存条件：

RNase-Free DNaseI 和 RDD 缓冲液置于 2-8℃ 保存，可保存 15 个月；其他试剂室温 (15-30℃) 保存，可保存 15 个月。加入 β-巯基乙醇的裂解液 RL2-8℃ 可放置一个月。

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。30-40min 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. 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 0.5MNaOH 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)，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 1mlRL 中加入 10 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RL2-8℃ 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。
4. 不建议将样本保存在裂解液中。

DNaseI 储存液的配制：

将 DNaseI 干粉 (1500U) 溶解在 550 μl RNase-Free ddH₂O 中，轻柔混匀，分装后 -30~-15℃ 贮存 (可保存 9 个月)。

注意：从 -30~-15℃ 融化后的 DNaseI 储存液保存于 2-8℃ (可保存 6 周)，不要再次冻存。

操作步骤 (仅供参考)：

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, $300 \times g$ 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)。

(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 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。

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。

沉淀细胞数量	裂解液 RL(μ l)
$<5^6 \times 10$	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	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(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), $12,000\text{rpm}(\sim 13,400 \times g)$ 离心 2min, 收集滤液。

4. 向滤液中加入 1 倍体积 70%乙醇(通常为 $350 \mu\text{l}$ 或 $600 \mu\text{l}$), 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), $12,000\text{rpm}(\sim 13,400 \times g)$ 离心 30-60sec, 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 ddH_2O , 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 $350 \mu\text{l}$ 去蛋白液 RW1, $12,000\text{rpm}(\sim 13,400 \times g)$ 离心 30-60sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CR3 放回收集管中。

6. DNaseI 工作液的配制: 取 $10 \mu\text{l}$ DNaseI 储存液放入新的 RNase-Free 离心管中, 加入 $70 \mu\text{l}$ RDD 缓冲液, 轻柔混匀。

7. 向吸附柱 CR3 中央加入 $80 \mu\text{l}$ 的 DNaseI 工作液, 室温放置 15min。

8. 向吸附柱 CR3 中加入 $350 \mu\text{l}$ 去蛋白液 RW1, $12,000\text{rpm}(\sim 13,400 \times g)$ 离心 30-60sec, 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 $500 \mu\text{l}$ 漂洗液 RW(使用前请先检查是否已加入乙醇), 室温静置 2min, $12,000\text{rpm}(\sim 13,400 \times g)$ 离心 30-60sec, 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. $12,000\text{rpm}(\sim 13,400 \times g)$ 离心 2min, 倒掉废液。将吸附柱 CR3 置于室温放置 2-5min, 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 μ l RNase-Free ddH₂O 室温放置 2min, 12,000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 2min, 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 溶液请于-70℃保存。

二. 从细菌中提取总 RNA

1. 4℃12,000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ 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(15-30℃)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 100 μ l 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 μ g/ml	3-5min
G+细菌	3mg/ml	5-10min

3. 加入 350 μ l 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, 12,000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 2min, 将上清转移至另一离心管中。

4. 加入 250 μ l 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), 12,000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 30-60sec, 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 μ l 去蛋白液 RW1, 12,000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 30-60sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。

6. DNaseI 工作液的配制: 取 10 μ l DNaseI 储存液放入新的 RNase-Free 离心管中, 加入 70 μ l RDD 缓冲液, 轻柔混匀。

7. 向吸附柱 CR3 中央加入 80 μ l 的 DNaseI 工作液, 室温放置 15min。

8. 向吸附柱 CR3 中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1, 12,000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 30-60sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。

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

10. 重复步骤 9。

11. 12,000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 2min, 倒掉废液。将吸附柱 CR3 置于室温放置 2-5min, 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 2min, 12,000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 2min, 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℃保存。

注意事项:

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。

2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

3. 实验结果受多种因素影响, 相关处理仅限于产品本身, 不涉及其他赔偿。

免责声明: 本公司将不为任何不正常使用此产品时所发生的意外负责。

北京伊事达科技有限公司

电话: 13564444959

官网: www.followme-shop.com

地址: 北京市海淀区东北旺西路58号尚科办公社区C区一楼



公众号



客服