固定组织 RNA 提取试剂盒

项目号: R669871

储存条件: -20℃。

产品内容

组分	50T
DNase I	1000U
10×Reaction Buffer	1000 μ l
Buffer RL	35ml
Buffer RW1	40ml
Buffer RW2 (concentrate)	11ml
RNase- Free Water	10ml
Spin Columns FL with Collection Tubes	50
with Collection Tubes with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	100

产品简介

本试剂盒采用高效、专一结合核酸的离心吸附柱和独特的缓冲系统，可从细菌或培养的动物细胞中快速提取总 RNA。30-40 分钟内即可完成反应，提取的总 RNA 纯度极高，没有蛋白质和其他污染，适用于 RT-PCR、Real-Time RT-PCR、芯片分析、体外翻译等实验。

自备试剂: Lysozyme、 β -巯基乙醇、无水乙醇（新开封或提取 RNA 专用）。

实验前准备及重要注意事项

1. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：

- 1) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
- 2) 配制溶液应使用无 RNase 的水。
- 3) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。

2. Buffer RL 在使用前请加入 β -巯基乙醇至终浓度为 1%，如 1 ml Buffer RL 加 10 μ l β -巯基乙醇。加入 β -巯基乙醇的 Buffer RL 4℃可保存 1 个月，如出现沉淀，请加热溶解后使用。

3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在 Buffer RW2 中加入无水乙醇。

4. 如未特殊说明，所有离心步骤均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。

操作步骤

1. 4℃ 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 分钟收集菌体（菌体量最大不超过 1×10^9 ），小心去除所有上清。

注意：上清如果有残留，会影响后续的消化过程。

2. 用含有 Lysozyme 的 100 μ l TE 缓冲液彻底重悬菌体，室温孵育。具体配方和孵育时间如下：

/	TE 缓冲液中 Lysozyme 的终浓度	孵育时间
G-细菌	400 μ g/ml	3-5 分钟
G+细菌	3mg/ml	5-10 分钟

3. 加入 350 μ l Buffer RL（使用前请检查是否加入 β -巯基乙醇），涡旋震荡混匀（此步骤可能出现不溶性沉淀），将溶液与沉淀全部加入到已装入收集管的过滤柱（Spin Columns FL）中，12,000 rpm 离心 2 分钟。

4. 向上步得到的滤液中加入 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已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RM）中，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃掉废液，将吸附柱重新放回收集管中。

5. 向吸附柱中加入 350 μ l Buffer RW1，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。

6. 配制 DNase I 混合液：取 52 μ l RNase-Free Water，向其中加入 8 μ l 10×Reaction Buffer 和 20 μ l DNase I (1U/ μ l)，混匀，配制成终体积为 80 μ l 的反应液。

7. 向吸附柱中直接加入 80 μ l DNase I 混合液，20-30℃孵育 15 分钟。

8. 向吸附柱中加入 350 μ l Buffer RW1，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer RW2（使用前检查是否加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 分钟，弃废液。

10. 重复步骤 9。

11. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm 离心 2 分钟。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

12. 将吸附柱装入新的 RNase-Free 的收集管中，向吸附膜的中间加入 30-50 μ l RNase-Free Water，室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟，收集 RNA 溶液，-70℃保存 RNA，防止降解。

注意：1) RNase-Free Water 体积不应小于 30 μ l，体积过小影响回收率。

2) 如果要提高 RNA 的产量，可用 30-50 μ l 新的 RNase-Free Water 重复步骤 12。

如果要提高 RNA 浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤 12。