

动物组织/细胞 RNA 提取试剂盒 (DNase I)

项目号: R669990

储存条件: -20°C 。

产品内容

组分	50T
DNase I	1000U
10×Reaction Buffer	1000 μl
Buffer RL	35ml
Buffer RW1	30ml
Buffer RW2 (concentrate)	11ml
RNase-Free Water	10ml
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	50

产品简介

本试剂盒将高效的异硫氰酸胍裂解技术与硅基质膜纯化技术相结合, 可从动物细胞及组织中高效提取总 RNA。起始样本一般最多 30 mg 组织或 1×10^7 细胞。本试剂盒还可回收未完全纯化的 RNA、体外转录和酶促反应后得到的 RNA。用本试剂盒可提取纯化分子量大于 200 碱基的高品质 RNA, 几乎无 DNA 残留。如果要进行对微量 DNA 非常敏感的 RNA 实验, 残留的 DNA 可利用无 RNase 的 DNase 在柱上进行消化去除。提取的 RNA 可用于 RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot 等下游实验。

自备试剂: 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. 提取的样品避免反复冻融, 否则影响 RNA 提取的量和质量。

3. Buffer RL 在使用前请加入 β -巯基乙醇, 1ml Buffer RL 加 10 μl β -巯基乙醇。加入 β -巯基乙醇的 Buffer RL 室温可保存 1 个月。

4. 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。

5. Buffer RL 如果产生沉淀, 可于 56°C 加热使其溶解后室温放置。

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. 样品处理

1a 组织：将组织在液氮中磨碎。每 20-30mg 组织加 600 μ l Buffer RL（使用前检查是否加入 β -巯基乙醇），组织样本少于 20mg 加 350 μ l Buffer RL。样品体积不超过 Buffer RL 体积的十分之一。

1b 单层培养细胞：将细胞在培养瓶中直接裂解或处理成细胞悬液，离心得到细胞沉淀，弃上清，每 6-10 cm² 培养面积加入 600 μ l Buffer RL，小于 6cm² 加入 350 μ l Buffer RL，反复吹打几次，使其充分裂解。

1c 细胞悬液：12,000 rpm（ $\sim 13,400\times g$ ）离心 1 分钟弃上清，得到细胞沉淀。每 5×10^6 - 1×10^7 细胞加入 600 μ l Buffer RL，少于 5×10^6 细胞加入 350 μ l Buffer RL，反复吹打几次，使其充分裂解。

注意：1）尽量除尽细胞培养基，细胞培养基可能抑制细胞的裂解影响 RNA 产量。

2）尽量使细胞充分悬浮并充分裂解，否则影响 RNA 产量。

2. 样品充分裂解后，室温放置 5 分钟，使蛋白核酸复合物完全分离。

3. 12,000 rpm 离心 2-5min，取上清进行以下操作。

4. 向步骤 3 中得到的溶液中加入 1 倍体积（600 μ l 或 350 μ l）的 70%乙醇（无 RNase 水配制），混匀。

注意：加入乙醇后可能会产生沉淀，不会影响后续实验。

5. 将上步所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RM）中，若一次不能将全部溶液加入吸附柱中，请分两次转入，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃废液。将吸附柱放回收集管中。

注意：吸附柱的最大载量为 100 μ g，不要超载，否则会影响 RNA 的产量和纯度。

6. 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。

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

8. 向吸附柱中直接加入 80 μ l DNase I 混合液，20-30 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。

9. 向吸附柱中加入 200 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。

10. 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，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 离心 2 分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干吸附柱中的无水乙醇。

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

13. 将吸附柱转入新的离心管中，向吸附膜中间位置加入 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 $^{\circ}$ C 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 13。

3）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 13。