

EasyPure[®] RNA Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: ER101

保存: 试剂盒在室温 (15-25°C)干燥条件下保存一年; DNase I和DNase I Reaction Buffer -20°C保存一年。

产品说明

本试剂盒适用于从培养的动物细胞、组织和大肠杆菌中快速提取总RNA。样品被异硫氰酸胍裂解, DNA被DNase I消化, RNA与硅胶膜离心柱特异地结合。提取的总RNA纯度高, 没有DNA和蛋白质污染, 可用于RT-PCR、qRT-PCR、芯片分析、Northern blot等实验。

试剂盒组成

Component	ER101-01(50 rxns)
Binding Buffer 4 (BB4)	40 ml
Clean Buffer 4 (CB4)	60 ml
Wash Buffer 4 (WB4)	12 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml
DNase I (3 units/μl)	1500 U
DNase I Reaction Buffer	4 ×1 ml
RNase-free Water	10 ml
RNase-free Tube (1.5 ml)	50个
RNA Spin Columns with Collection Tubes	50个

样品要求

Sample type	Sample Amount	Amount of BB4 (prepared with 2-mercaptoethanol)
Animal cell	≤5×10 ⁶	0.3-0.6 ml
Animal tissue	≤20 mg	0.3-0.6 ml
Bacterial cell	≤1×10 ⁹	0.35 ml

样品处理

A培养动物细胞

对于悬浮细胞, 先收集细胞后裂解, 对于单层贴壁细胞, 可以直接裂解, 也可以先收集细胞后裂解。

1、收集细胞

- 悬浮细胞的收集 (收集细胞数量请不要超过5×10⁶): 转移细胞到RNase-free离心管中, 2-8°C 12,000g离心5分钟。仔细吸净所有培养基上清。
- 单层贴壁细胞的收集 (收集细胞数量请不要超过5×10⁶): 使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀; 或吸净所有培养基, 直接在培养容器中加入相应体积的BB4 (每1 ml BB4, 加10 μl β-巯基乙醇, 现用现配) 裂解 (容器直径不超过10 cm), 然后进行均质化处理。

2、裂解处理

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, 加入相应体积的裂解液BB4 (每1 ml BB4, 加10 μl β-巯基乙醇, 现用现配)。剧烈涡旋, 直至细胞沉淀分散均匀。

注意: 当细胞数量≤1×10⁶, BB4用量0.3 ml; 当细胞数量1×10⁶≤5×10⁶, BB4用量0.6 ml。

3、均质化处理

用RNase-free的针管反复吹吸5-10次, 使溶液均质化。

4、室温12,000×g离心5分钟, 吸上清于一RNase-free的离心管中。



B 动物组织

- 1、先加液氮冷冻组织，用研磨杵将组织研磨成粉末，将粉末转移到离心管中，每10 mg左右的组织加0.3 ml的BB4（每1 ml BB4，加10 μ l β -巯基乙醇，现用现配）和15 μ l Proteinase K，混匀后56 $^{\circ}$ C处理10-20分钟。
- 2、室温12,000 \times g离心5分钟，吸上清于一RNase-free的离心管中。
注意：当组织量 \leq 10 mg，BB4用量0.3 ml；当组织量 \leq 10 -20 mg，BB4用量0.6 ml。

C 细菌细胞

- 1、2-8 $^{\circ}$ C 12,000 \times g离心2分钟收集菌液（收集细胞的密度不超过 1×10^9 ），彻底去除所有培养基上清。
注：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，1 mg lysozyme溶于100 μ l TE中）彻底重悬菌体。
- 3、加入350 μ l BB4（每1 ml BB4，加10 μ l β -巯基乙醇，现用现配），涡旋振荡混匀，室温孵育5分钟。
- 4、均质化处理
用无RNA酶污染的针管反复吹吸5-10次，使溶液均质化。
- 5、室温12,000 \times g离心2分钟，吸上清于一RNase-free的离心管中。

RNA提取

使用前加入48 ml无水乙醇到WB4中。

- 1、对于细胞、和组织RNA提取，向上清中加入1倍体积70%乙醇；对于细菌RNA提取，向上清中加入250 μ l 100%乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。
注意：配制70%乙醇时请使用RNase-free Water。
- 2、涡旋彻底混匀，分散沉淀。将得到的溶液和沉淀一起加入离心柱中，12,000 \times g离心30秒，弃掉流出液（如果体积大于离心柱容量，可以分几次完成）。
- 3、向离心柱中加500 μ l CB4，室温12,000 \times g离心30秒，弃掉流出液。
如需要去除基因组，向离心柱中央加入80 μ l的DNase I工作液，室温放置15分钟，重复步骤3一次。[DNase I工作液的配制：取70 μ l Reaction Buffer放入RNase-free的管中，再加入10 μ l（30 U）的DNase I混匀]。
- 4、加500 μ l WB4，室温12,000 \times g离心30秒，弃掉流出液。
- 5、重复步骤4一次。
- 6、室温12,000 \times g离心2分钟，彻底去除残留的乙醇。
- 7、将离心柱转入一个新1.5 ml RNase-free的离心管中，并向离心柱中央加30-100 μ l RNase-free Water，室温静置1分钟。
- 8、室温12,000 \times g离心2分钟，洗脱RNA。
- 9、将RNA置于-80 $^{\circ}$ C保存。

注意事项

- 所有离心均在室温下进行。
- BB4使用时，请先检查是否已加入 β -巯基乙醇。
- WB4使用前，请先检查是否已加入无水乙醇。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

