

Cell/Bacterial Total RNA Extraction Kit

细胞/细菌样本总 RNA 提取试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL1211A	细胞/细菌样本总 RNA 提取试剂盒	50T

产品简介:

本产品可以从培养的动物细胞或细菌中快速提取总 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用酚、氯仿等有毒试剂抽提，整个提取过程只需 30~40 min。试剂盒采用膜过滤及 DNase I 消化，可高效地去除基因组 DNA，提取的总 RNA 纯度高，基本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:

- ✧ 操作简便：30~40min 内完成数个样品的总 RNA 提取；
- ✧ 安全低毒：无需酚、氯仿等有毒试剂；
- ✧ 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；
- ✧ 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。

产品组成:

编号	组分	规格
BL1211A-1	Buffer BRL	30 mL
BL1211A-2	Buffer RW1	40 mL
BL1211A-3	Buffer PW2	12 mL
BL1211A-4	RNase-Free ddH ₂ O	15 mL
BL1211A-5	RNase-Free DNase I	100 µL
BL1211A-6	DNase Buffer	1.5 mL
BL1211A-7	RNase-Free RNA Columns	50 套
BL1211A-8	RNase-Free gDNA Remove Columns	50 套

使用方法

第一次使用前应在漂洗液 Buffer PW2 中加入 48 mL 的无水乙醇。

一、从培养细胞中提取总 RNA

1. 样本收集:

1.1 悬浮细胞：估计细胞/细菌数量，300×g 离心 5 min，将细胞收集到离心管中，去除所有的培养基上清，立即进行步骤 2；

注：本试剂盒单次可处理 10²~10⁷ 个细胞。初次使用时，建议使用 2~5×10⁶ 个细胞。根据结果再调整细胞量。但不论何种情况，细胞量不要超过 1×10⁷。

1.2 贴壁细胞：可直接在培养容器中裂解（容器直径不超过 10 cm），或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀；

(a) 直接裂解法：彻底吸除培养液，立即进行步骤 2；

(b) 胰蛋白酶处理法：彻底吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞，吸除 PBS，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

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



白酶，将细胞溶液转移至 RNase-Free 的离心管中，300×g 离心 5 min，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清，立即进行步骤 2。

2. 样本裂解：

(a) 对于离心得到的细胞/细菌沉淀：轻弹离心管底部，使沉淀松散，加入适量的 Buffer BRL（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；

细胞量	Buffer BRL
<5×10 ⁶ 个	350 μL
≥5×10 ⁶ 个	600 μL

(b) 对于直接裂解的细胞：加入适量的 Buffer BRL（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；

培养皿直径	Buffer BRL
<6 cm	350 μL
6~10 cm	600 μL

3. 将所有溶液转移至过滤柱 RNase-Free gDNA Remove Columns 中，12,000rpm(~13,400×g) 离心 2 min，收集滤液；

4. 向滤液中加入 1 倍体积的 70%无水乙醇（通常为 350 μL 或 600 μL），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 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；

注：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。

5. 向吸附柱中加入 350 μL 去蛋白液 Buffer RW1，12,000 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. DNase I 工作液配制：2 μL DNase I+28 μL DNase Buffer，轻轻吹打混匀；

7. 向吸附柱中央加入 30 μL 的 DNase I 工作液，室温放置 15 min；

8. 向吸附柱中加入 350 μL 去蛋白液 Buffer RW1，12,000 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；

9. 向吸附柱中加入 500 μL 漂洗液 Buffer PW2（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；

10. 重复步骤 9；

11. 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；

注：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。

12. 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×g)离心 2 min，得到 RNA 溶液，

13. 将洗脱的 RNA 置于-80 °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。

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 1×10⁹），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；

细菌种类	溶菌酶浓度	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 μ L 的裂解液 Buffer BRL（使用前请先检查是否已加入 β -巯基乙醇），涡旋震荡混匀；

注：若出现不溶性沉淀，可在步骤 4 前先将样品于 12,000 rpm($\sim$ 13,400 $\times$ 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 gDNA Remove Columns 中，12,000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 2 min，收集滤液；

5. 加入 250 μ L 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 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；

6. 向吸附柱中加入 350 μ L 去蛋白液 Buffer RW1，12,000 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；

7. DNase I 工作液配制：2 μ L DNase I+28 μ L DNase Buffer，轻轻吹打混匀；

8. 向吸附柱中央加入 30 μ L 的 DNase I 工作液，室温放置 15 min；

9. 向吸附柱中加入 350 μ L 去蛋白液 Buffer RW1，12,000 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；

10. 向吸附柱中加入 500 μ L 漂洗液 Buffer PW2（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；

11. 重复步骤 10；

12. 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。

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 μ L RNase-Free ddH₂O，室温放置 2 min，12,000 rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g)离心 2 min，得到 RNA 溶液，将洗脱的 RNA 置于-80 $^{\circ}$ 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 μ L。）

注意事项：

1. 操作前在 Buffer BRL 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 mL Buffer BRL 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 Buffer BRL 置于 2~8 $^{\circ}$ C 可保存一个月。Buffer BRL 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；
2. 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；
3. 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；
4. RNA 在 Buffer BRL 中时不会被 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 $^{\circ}$ 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；
5. 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；
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：

室温保存 12 个月，RNase-Free DNase I 和 DNase Buffer 置于-20 $^{\circ}$ C 保存。

