

Flying Shark[®] Total RNA Micro Kit (DNase I)

超微量样品总 RNA 提取试剂盒 (DNase I)

目录号: **RNE65**

试剂盒组成

Component	RNE65 (50 preps)
DNase I	250 µl (250 U)
10× Reaction Buffer	100 µl
Buffer RL	30 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
RNase-free H ₂ O	10 ml
Spin Columns RA2 with Collection Tubes	50

保存方法

DNase I 及 10×Reaction Buffer -20℃ 保存, 其它组分室温 (15-30℃)。

产品介绍

本品为超微量 RNA 提取的专用试剂盒。适用于从超微量的细胞、组织、昆虫、植物、细菌等样品中提取总 RNA。处理范围一般为细胞 (10-10⁴) 或者组织 (<5 mg)。配有 DNA 酶柱上消化试剂, 得到的 RNA 无 DNA 残留, 可直接用于下游荧光定量 PCR 或者高通量测序等试验。

注意事项

1. 无垫圈离心柱设计确保离心后无液体残留和污染。保证了回收 RNA 高纯度。
2. 微量 10 µg 离心柱设计可以最低 6 µl 洗脱, 保证了提取 RNA 的高浓度。
3. 提取的样品避免反复冻融, 否则影响 RNA 提取得率和质量。
4. 低温储存时如果 Buffer RL 产生沉淀, 请水浴加热使其溶解后使用。
5. **第一次使用 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。**

操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行；用户需自备 70%乙醇用于步骤 2，配制 70%乙醇时使用去离子水或 DEPC 处理水均可。）

1. 样本处理

组织

- a) 5 mg 以内的组织加 300 μ l Buffer RL 后匀浆。

注意：其它难裂解的组织，细菌，酵母，植物匀浆需配合高速珠磨均质仪器和适合裂解珠（玻璃珠，钢珠，铅珠等）。

- b) 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 1 min，沉淀不能裂解的组织碎片，吸取上清进行步骤 2。

贴壁细胞

去除液体培养基后，直接往培养板中加入 Buffer RL 溶解细胞，并用移液枪反复吹打充分裂解混匀。依据细胞的数量来决定所需的 Buffer RL (10^5 细胞以内加 100 μ l, 10^6 细胞以内加 300 μ l)。裂解完成后进行步骤 2。

悬浮细胞

离心沉淀细胞($\leq 500 \times g$)，完全去除上清后用 Buffer RL 重悬细胞沉淀 (10^5 细胞以内加 100 μ l, 10^6 细胞以内加 300 μ l)，用移液枪反复吹打裂解混匀。裂解完成后进行步骤 2。

2. 估计上清体积，加入与上清液等体积的 70%乙醇（匀浆过程中损失的体积应减去），涡旋充分混匀。
3. 将得到的溶液转入已装入收集管的超微量吸附柱（Spin Columns RA2）中，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
4. 向超微量吸附柱 RA2 中加入 350 μ l Buffer RW1，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
5. 配制 DNase I 混合液：取 13 μ l RNase-Free H₂O，向其中加入 2 μ l 10 \times Reaction Buffer 和 5 μ l DNase I (1 U/ μ l)，轻柔混匀，配制成终体积为 20 μ l 的混合液。处理多个样品可按比例放大配制混合液。
6. 向 RA2 硅胶膜上加入 20 μ l DNase I 混合液，室温（20-30 $^{\circ}$ C）放置 15 min。
7. 向 RA2 中加入 350 μ l Buffer RW1，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液，将吸附柱重新放回回收管中。
8. 向 RA2 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 30 s，弃废液。
9. 重复步骤 8。
10. 将 RA2 放回空收集管内，12,000 rpm 离心 2 min，弃收集管。
注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。
11. 将 RA2 放入新的 RNase-free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 15 μ l RNase-Free H₂O，室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液，-70 $^{\circ}$ C 保存。
注意：减少洗脱液体积可以提高 RNA 浓度，但是最低洗脱液体积不应少于 6 μ l。