



# RNApure Tissue&Cell Kit (DNase I) 动物组织/细胞RNA提取试剂盒 (DNase I)

目录号：CW0560S (50 preps)

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

## 产品内容

Component	CW0560S 50 preps
DNase I	1000 U
10×Reaction Buffer	1000 $\mu$ l
Buffer RL	35 ml
Buffer RW1	30 ml
Buffer RW2 ( concentrate )	11 ml
RNase-Free Water	10 ml
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 $1 \times 10^7$ 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10μl 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℃加热使其溶解后室温放置。
6. 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20-30 mg组织加600  $\mu$ l Buffer RL（使用前检查是否加入 $\beta$ -巯基乙醇），组织样本少于20 mg加350  $\mu$ 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  $\text{cm}^2$ 培养面积加入600  $\mu$ l Buffer RL，小于6  $\text{cm}^2$ 加入350  $\mu$ 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 $5\times 10^6$ - $1\times 10^7$ 细胞加入600  $\mu$ l Buffer RL，少于 $5\times 10^6$ 细胞加入350  $\mu$ 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  $\mu$ l 或350  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l RNase-Free Water，向其中加入8  $\mu$ l 10 $\times$ Reaction Buffer和20  $\mu$ l DNase I（1 U/ $\mu$ l），混匀，配制成终体积为80  $\mu$ l的反应液。

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

9. 向吸附柱中加入200  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu\text{l}$  RNase-Free Water，室温放置1分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集RNA溶液， $-70^{\circ}\text{C}$ 保存RNA，防止降解。

**注意：1) RNase-Free Water体积不应小于30  $\mu\text{l}$ ，体积过小影响回收率。**

**2) 如果要提高RNA的产量，可用30-50  $\mu\text{l}$ 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。**

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途