



RNApure Bacteria Kit (DNase I)

细菌RNA提取试剂盒 (DNase I)

目录号： CW0539S (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	CW0539S 50 preps
DNase I	1000 U
10×Reaction Buffer	1000 μl
Buffer RL	35 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	11 ml
RNase-Free Water	10 ml
Spin Columns FL with Collection Tubes	50
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	100

产品简介

本试剂盒采用高效、专一结合核酸的离心吸附柱和独特的缓冲系统，可从细菌或培养的动物细胞中快速提取总RNA。30-40分钟内即可完成反应，提取的总RNA纯度极高，没有蛋白质和其他污染，适用于RT-PCR、Real-Time RT-PCR、芯片分析、体外翻译等实验。

自备试剂： Lysozyme (CW0887S)、 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. Buffer RL在使用前请加入 β -巯基乙醇至终浓度为1%，如1 ml Buffer RL加10 μ l β -巯基乙醇。加入 β -巯基乙醇的Buffer RL 4 $^{\circ}$ C可保存1个月，如出现沉淀，请加热溶解后使用。
3. 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。
4. 如未特殊说明，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. 4℃ 12,000 rpm (~13,400×g) 离心2分钟收集菌体（菌体量最大不超过 1×10^9 ），小心去除所有上清。

注意：上清如果有残留，会影响后续的消化过程。

2. 用含有Lysozyme的**100 μl TE缓冲液**彻底重悬菌体，室温孵育。具体配方和孵育时间如下：

	TE缓冲液中Lysozyme的终浓度	孵育时间
G-细菌	400 μg/ml	3-5分钟
G+细菌	3 mg/ml	5-10分钟

3. 加入**350 μl Buffer RL（使用前请检查是否加入β-巯基乙醇）**，涡旋震荡混匀（此步骤可能出现不溶性沉淀），将溶液与沉淀全部加入到已装入收集管的过滤柱（Spin Columns FL）中，12,000 rpm离心2分钟。
4. 向上步得到的滤液中加入**250 μl无水乙醇**，混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RM）中，12,000 rpm离心1分钟，弃掉废液，将吸附柱重新放回收集管中。
5. 向吸附柱中加入**350 μl 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。
6. 配制DNase I 混合液：取**52 μl RNase-Free Water**，向其中加入**8 μl 10×Reaction Buffer**和**20 μl DNase I（1 U/μl）**，混匀，配制成终体积为**80 μl**的反应液。
7. 向吸附柱中直接加入**80 μl DNase I 混合液**，20-30℃孵育15分钟。
8. 向吸附柱中加入**350 μl 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。
9. 向吸附柱中加入**500 μl Buffer RW2（使用前检查是否加入无水乙醇）**，12,000 rpm离心1分钟，弃废液。
10. 重复步骤9。
11. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm离心2分钟。

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

12. 将吸附柱装入新的**RNase-Free**的收集管中，向吸附膜的中间加入**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**12**。

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**12**。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其他用途