

GTpure™ 总 RNA 提取试剂盒

一、产品组成

Cat.NO.	326-050
包装	50 次
离心柱 C739	50 个
收集管	50 个
RI Buffer	40ml
WR1 Buffer	30ml
WR2 Buffer	12ml
RE Buffer	10ml
说明书	1 份

二、试剂盒储存

试剂盒所有组分在室温（15-25 度）干燥条件下可保存 1 年。

三、使用前注意事项

1. 检查 RI Buffer 中是否有沉淀，如有沉淀请在 37 度孵育溶解。
2. 请用 RNase-free ddH₂O 配置 70%乙醇。
3. 每次使用 RI Buffer 前，加入 β-巯基乙醇，1ml RI Buffer 中加入 10μl β-巯基乙醇，加入 β-巯基乙醇的 RI Buffer 只能保存 1 个月。**推荐：现用现加入 β-巯基乙醇。**
4. 向 WR1 Buffer 中加入 15ml 无水乙醇，WR2 Buffer 中加入 48ml 无水乙醇，注意使用前振荡几次混匀溶液，使用后室温密闭保存。
5. 离心柱的最大吸附量是 150μg。如果使用样品过量，会导致 RNA 产量降低。
6. 准备一个 RNase-free 的 25 号针头注射器用于匀浆，或其他匀浆设备。
7. 所用容器请进行 RNase-free 处理。请选用 RNase-free 枪头和离心管，以避免提取过程中 RNA 被 RNase 降解。
8. 将研钵和研杵倒入液氮进行预冷。
9. 在操作过程中保持环境中无 RNase 的污染，尽量勤更换手套以防污染。

四、操作步骤

【提取动物细胞总 RNA】

1. 收集培养细胞的数量不超过 1×10^7 ，取适量悬浮液装入离心管中，300×g 离心 5 分钟，收集细胞沉淀，小心尽量吸除上清。

***如果是贴壁培养细胞，可直接在培养容器中裂解，或使用胰蛋白酶处理后收集细胞。**

【直接在培养容器中裂解细胞】：确定细胞数量，尽量吸除培养基，立即进行第 2 步裂解步骤。

【胰蛋白酶处理细胞法】：确定细胞数量，吸除尽可能多的细胞培养基，用 PBS 洗涤细胞，吸去上清，向细胞中加入含有 0.1-0.25%胰蛋白酶 PBS 处理细胞。在细胞脱离培养皿或培养瓶后，加入一些培养基以抑制胰蛋白酶活性，转移细胞至 RNase-free 的离心管中，300×g 离心 5 分钟收集细胞。彻底吸除上清，继续第 2 步。

2. 轻弹离心管彻底使细胞沉淀松散，加入适当体积 RI Buffer(见下表)，旋涡振荡或抽吸混匀。

收集细胞的数量	加入 RI Buffer 体积
1×10^6	300 μl
$1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600 μl

***确保 RI Buffer 在使用前加入 β-巯基乙醇。**

***细胞沉淀不完全松散可能导致裂解不完全，降低 RNA 产量。**

3. 使用 25 号针头注射器，将针头伸入溶液中，反复抽吸样品至少 2 分钟使其匀浆化，或旋涡混匀。
4. 加入等体积（300 或 600μl）70%乙醇立即混匀。

***加入乙醇后可能产生沉淀，请将沉淀及混合物一并放入离心柱内，并不影响后续步骤。**

继续下面的第 5 步。

【提取动物组织总 RNA】

1. 用液氮将动物组织研磨成粉末。快速称取适当重量地粉末状放入 2ml 离心管中。

*** 称重过程应非常迅速，避免在进入第 2 步前样品融化。**

*** 加入 RI Buffer 前避免组织融化。**

2. 向组织粉末中加入适量的 RI Buffer(见下表)，立即使用有 25 号针头注射器，通过针头将溶液反复抽吸至少 2 分钟使溶液均质化，或旋涡混匀。

*** 请确保 RI Buffer 使用前已加入 β -巯基乙醇。**

起始材料量	加入 RI Buffer 体积
10mg	200 μ l
20mg	400 μ l
30mg	600 μ l
50mg	1000 μ l
100mg	2000 μ l

3. 将组织裂解液 20000 \times g 离心 5 分钟或者直到形成紧实的沉淀。用移液器小心转移上清至新的 2ml RNase-free 离心管中。

*** 在某些实验中，会有一些非常小的不溶解的组织块存在，应避免吸到小块，否则在加入乙醇后会出现大块沉淀导致离心柱堵塞。**

4. 加入等体积的 70%乙醇立即混匀。

*** 加入乙醇后可能产生沉淀，请将沉淀及混合物一并放入离心柱内，并不影响后续步骤。**

继续下面的第 5 步

5. 将离心柱 C739 放入 2ml 收集管中，一次吸取最多 700 μ l 混合液至离心柱内，包括任何可能形成的沉淀也一并转入。8000 \times g 离心 15 秒，弃废液，离心柱放回收集管内。如果样品体积超过 700 μ l，将剩余样品再次转入离心柱。

*** 可选择步骤：去除 RNA 样品中基因组 DNA 的污染**

第 5 步完成后，可选择在离心柱的吸附膜上加入 DNase I 消化 DNA，DNase I 可在后续的漂洗步骤中被有效去除。

【DNase I 贮存液】的制备：将 2000U 的 DNase I 溶于 800 μ l RNase-free 水中即可。长期保存 DNase I，应按单次使用量分小等份，放在-20 度最多可保存 9 个月。融化的 DNase I 在 2-8 度最多可保存 6 周，融化的小份包装不要再次冷冻。

【DNase I 反应缓冲液】的制备：1M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 和 10 mM MnCl₂, pH 7.0。

DNase I 消化步骤：第 5 步完成后，继续以下 D1-D3 步：

D1. **【DNase I 工作液】**的制备：在 RNase-free 的 0.5 ml 离心管中分别加入 10 μ l **【DNase I 贮存液】**和 90 μ l **【DNase I 反应缓冲液】**，温和翻转几次混匀即可。

注意：DNase I 对于物理因素引起的变性非常敏感，在操作过程中一定要温和，切勿使用漩涡震荡！

D2. 吸取 D1 步制备的 100 μ l **【DNase I 工作液】**加在离心柱的**膜中央**，25 度孵育 15 分钟。

注意：请将 DNase I 稀释液直接加到膜中央！

D3. 请继续第 6 步。

6. 加入 700 μ l WR1，8000 \times g 离心 15 秒，弃废液。
7. 加入 500 μ l WR2，8000 \times g 离心 15 秒，弃废液。
8. 加入 500 μ l WR2，8000 \times g 离心 2 分钟，弃废液。
9. 将离心柱放入收集管内，12000 \times g 离心 1 分钟。
10. 将离心柱放入一个 RNase-free 的离心管内，向离心柱内的膜中央加入 50 μ l RE，室温放置 1 分钟，8000 \times g 离心 1 分钟。

*** 确保将 RE 加入到离心柱的膜中央。**

生产商：基因科技（上海）有限公司
地址：上海市桂平路 69 号 25 号楼 6 楼
电话：021-51876181
传真：021-64957610
网址：www.genetech.com.cn