

- 5 将所有溶液转入过滤柱RNase-Free gDNA Remove Column中, 12,000 rpm(~13,400×g) 离心2 min, 收集滤液。
 - 6 在所得的液体中加入250 μL的无水乙醇, 用移液枪吸打3~5次充分混匀 (此时可能会出现沉淀), 将得到溶液和沉淀混合物一起转入RNase-Free RNA Column中, 12,000 rpm(~13,400×g) 离心30~60 s, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。
 - 7 向吸附柱中加入350 μL Buffer GRW1, 12,000 rpm(~13,400×g) 离心30~60 s, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。
 - 8 向吸附柱中央加入30 μL的DNase I工作液 (请确认已按照2 μL DNase I+28 μL DNase Buffer混合配制), 室温放置15 min。
 - 9 向吸附柱中加入350 μL Buffer GRW1, 12,000 rpm(~13,400×g) 离心30~60 s, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。
 - 10 向吸附柱中加入500 μL Buffer GRW2 (使用前确认已加入无水乙醇), 室温静置2 min。12,000 rpm(~13,400×g) 离心30~60 s, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。
 - 11 重复步骤10。
 - 12 12,000 rpm(~13,400×g) 离心2 min, 弃掉废液, 将吸附柱置于室温开盖放置数分钟, 以彻底晾干吸附柱中残余的液体。
- 【注意】若晾干不彻底, 可能会影响后续的RT等实验。
- 13 将吸附柱放入一个新的1.5 mL离心管中, 根据实验需要, 向吸附膜的中间部位小心悬空滴加30-100 μL RNase-Free ddH₂O, 室温静置2 min, 12,000 rpm(~13,400×g) 离心2 min, 离心管中得到RNA溶液。得到的RNA溶液可置于-80℃保存或立即用于后续实验。
- 【注意】洗脱液体积过小会影响回收效率, 最小的洗脱体积是30 μL。

常见问题与解答

问题	可能原因	建议
RNA得率低	样品裂解不充分	建议参考说明书充分振荡样品, 使样品充分裂解
	样品用量过多	建议按照说明书要求适量取样
	洗脱不充分	RNase-Free ddH ₂ O需直接加到膜中央, 并静置2min 后再离心, 必要时可进行二次洗脱以提高产量
	吸附柱有乙醇残留	使用Buffer GRW2漂洗后需要开盖晾干吸附柱中的乙醇
RNA降解	样品过量, 影响裂解液的裂解能力, 造成RNase未被充分抑制, 导致RNA降解	请参考使用说明推荐取样量, 若要增加样品起始量, 则后续实验中各溶液量均要等比例增加。对于内源RNase含量较多的样品应减少样品量, 可适当增加裂解液用量
	电泳过程中发生降解	使用RNase-Free的Loading Buffer、琼脂糖和缓冲液等
	环境、试剂或耗材中含有RNase	使用RNase-free的试剂及耗材, 建议在超净台中操作
DNA污染	样品裂解时加入的试剂量过少	请参考使用说明推荐试剂量
	去除基因组DNA的操作不够	若DNA含量较多, 可延长DNase I消化时间或重复消化
	次生代谢物较多	次生代谢物含量高的样本在提取RNA时易出现基因组的污染

S250701

Cell/Bacterial Total RNA Extraction Kit

培养细胞/细菌总RNA提取试剂盒 (离心柱型)

产品编号: MA2009 规格: 5T / 50T

产品内容

产品组成	MA2009-T 5T	MA2009-1 50T
Buffer GBRL	4 mL	30 mL
Buffer GRW1	5 mL	40 mL
Buffer GRW2	2.4 mL (Add 9.6 mL absolute ethanol before use)	12 mL (Add 48 mL absolute ethanol before use)
RNase-Free ddH ₂ O	1 mL	15 mL
RNase-Free DNase I	10 μL	100 μL
DNase Buffer	200 μL	1.5 mL
RNase-Free gDNA Remove Columns	5 Rxns	50 Rxns
RNase-Free RNA Columns	5 Rxns	50 Rxns
说明书	1份	1份

产品简介

培养细胞/细菌总RNA提取试剂盒 (Cell/Bacterial Total RNA Extraction Kit) 是基于硅胶柱纯化技术的离心柱式总RNA提取试剂盒。试剂盒采用膜过滤及DNase I消化, 可更大程度的去除基因组DNA, 高效且专一的得到总RNA。本产品适用于从培养的动物细胞或者细菌中快速提取总RNA。整个提取流程可在30~40分钟内完成, 无需使用酚和氯仿等有毒试剂。提取的总RNA纯度高、完整性好, 最大程度减少了DNA、蛋白等杂质污染, 可直接用于RT-PCR、qRT-PCR、Northern Blot、芯片分析、Dot Blot、Poly A筛选、体外翻译、RNA酶保护分析及分子克隆等实验。

保存条件

RNase-Free DNase I和DNase Buffer置于-20℃保存, 其余组分常温保存。自生产之日起12个月有效。

注意事项

1. 使用前请一定按照使用说明2的要求配制相关溶液。
2. RNA在Buffer GBRL中时不会被RNase降解, 但提取后继续处理过程中如果需要用到塑料和玻璃器皿则应使用RNase-Free的。玻璃器皿可在150℃烘烤4h, 塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min, 然后用RNase-Free水彻底清洗, 再灭菌。更建议使用一次性的RNase-free实验器具, 并且RNA实验专用, 不要用于其它实验, 避免交叉污染。
3. 为了预防RNase污染, 请经常更换新手套, 以防止来自皮肤表面的RNase污染物。
4. 提取RNA过程建议在专门做RNA的超净台中进行, 如有必要请提前喷洒核酸酶清除试剂。
5. 为了您的安全和健康, 操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

大连美仑生物技术有限公司

官网: <https://www.meilunbio.com/>
电话/邮箱: 0411-62910999 sales@meilune.com

本产品仅供科研使用



使用说明（以下操作无明确指明，均在室温下进行）

（一）培养细胞的总RNA提取

1 需自备材料

1.1 试剂：无水乙醇、β-巯基乙醇、70%乙醇（用RNase-free水配制）

1.2 耗材：RNase-Free的枪头和离心管

2 试剂准备

2.1 第一次使用前，应在Buffer GRW2中加入标签标识体积的无水乙醇。

2.2 每次操作前，应在Buffer GBRL中加入终浓度1%的β-巯基乙醇（如在1 mL Buffer GBRL中加入10 μL β-巯基乙醇），现配现用，加过β-巯基乙醇的Buffer GBRL置于2~8℃可保存一个月。

【注意】加过β-巯基乙醇的Buffer GBRL在储存过程中如果出现沉淀，请加热溶解后使用。

2.3 每次操作前，应配制DNase I工作液，按照需要量每2 μL DNase I加28 μL DNase Buffer，轻轻吹打混匀，现用现配。

3 收集细胞

3.1 贴壁细胞（收集细胞数量不要超过 1×10^7 个）：可以选择①直接在培养器皿中裂解（培养器皿直径不超过10 cm），或②使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀（在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法）。

① 直接裂解法：彻底吸弃原培养液，然后立即进行步骤4.1裂解处理。

【注意】细胞培养液要去除干净，否则会导致裂解不完全，造成RNA得率降低。

② 胰蛋白酶处理法：吸弃原培养液，用PBS洗涤细胞1次，彻底吸弃PBS。向细胞中加入0.10~0.25%胰蛋白酶消化液，37℃孵育消化，当细胞脱离底面时，加入含有血清的培养基终止消化，用移液枪将所有细胞从底面吹打下来混匀，转移至RNase-Free的离心管中，300×g离心5 min，仔细去除所有的上清，收集细胞沉淀，然后立即进行步骤4.2裂解处理。

3.2 悬浮细胞（收集细胞数量不要超过 1×10^7 个）：将所有细胞悬液转移至RNase-Free的离心管中，300×g离心5 min，仔细去除所有的上清，收集细胞沉淀，然后立即进行步骤4.2裂解处理。

4 裂解处理

4.1 对于直接裂解的细胞：向细胞中加入以下参考量的Buffer GBRL（使用前请确认已加入β-巯基乙醇），轻微晃动，使液体充分覆盖细胞表面，使用移液枪吹打几次使细胞脱离底面，将所有细胞悬液转移到离心管中，涡旋震荡混匀。

培养器皿底面直径 (cm)	Buffer GBRL添加量 (μL)
< 6	350
6~10	600

4.2 对于离心得到的细胞：轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加入以下参考量的Buffer GBRL（使用前请确认已加入β-巯基乙醇），涡旋震荡混匀。

离心细胞数量 (个)	Buffer GBRL添加量 (μL)
< 5×10^6	350
$5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	600

5 将所有溶液转入过滤柱RNase-Free gDNA Remove Column中，12,000 rpm(~13,400×g) 离心2 min，收集滤液。

6 在所得的液体中加入1倍体积的70%乙醇（用RNase-free水配制）（通常为350 μL或600 μL），用移液枪吸打3~5次充分混匀（此时可能会出现沉淀），将得到溶液和沉淀混合物一起转入RNase-Free RNA Column中，12,000 rpm(~13,400×g) 离心30~60 s，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。

【注意】如果滤液体积有损失，请相应调整70%乙醇的用量。

7 向吸附柱中加入350 μL Buffer GRW1，12,000 rpm(~13,400×g) 离心30~60 s，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。

8 向吸附柱中央加入30 μL的DNase I工作液（请确认已按照2 μL DNase I+28 μL DNase Buffer混合配制），室温放置15 min。

9 向吸附柱中加入350 μL Buffer GRW1，12,000 rpm(~13,400×g) 离心30~60 s，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。

10 向吸附柱中加入500 μL Buffer GRW2（使用前确认已加入无水乙醇），室温静置2 min。12,000 rpm(~13,400×g) 离心30~60 s，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。

11 重复步骤10。

12 12,000 rpm(~13,400×g) 离心2 min，弃掉废液，将吸附柱置于室温开盖放置数分钟，以彻底晾干吸附柱中残余的液体。

【注意】若晾干不彻底，可能会影响后续的RT等实验。

13 将吸附柱放入一个新的1.5 mL离心管中，根据实验需要，向吸附膜的中间部位小心悬空滴加30~100 μL RNase-Free ddH₂O，室温静置2 min，12,000 rpm(~13,400×g) 离心2 min，离心管中得到RNA溶液。得到的RNA溶液可置于-80℃保存或立即用于后续实验。

【注意】洗脱液体积过大会影响回收效率，最小的洗脱体积是30 μL。

（二）细菌的总RNA提取

1 需自备材料

1.3 试剂：无水乙醇、β-巯基乙醇、含有溶菌酶的TE缓冲液

1.4 耗材：RNase-Free的枪头和离心管

2 试剂准备

2.1 第一次使用前，应在Buffer GRW2中加入标签标识体积的无水乙醇。

2.2 每次操作前，应在Buffer GBRL中加入终浓度1%的β-巯基乙醇（如在1 mL Buffer GBRL中加入10 μL β-巯基乙醇），现配现用，加过β-巯基乙醇的Buffer GBRL置于2~8℃可保存一个月。

【注意】加过β-巯基乙醇的Buffer GBRL在储存过程中如果出现沉淀，请加热溶解后使用。

2.3 每次操作前，应配制DNase I工作液，按照需要量每2 μL DNase I加28 μL DNase Buffer，轻轻吹打混匀，现用现配。

3 收集细菌（收集的菌体最大量不超过 1×10^9 ）：4℃ 12,000 rpm(~13,400×g) 离心2 min，仔细去除所有的上清，收集菌体，然后立即进行步骤4裂解处理（后续所有离心步骤均在室温下进行）。

【注意】细菌培养液要去除干净，否则会对后续的细胞壁消化产生抑制。

4 裂解处理菌体：参考下表，用100 μL含有溶菌酶的TE缓冲液（自备）彻底重悬菌体，室温孵育。

	TE缓冲液中溶菌酶的终浓度	孵育时间 (min)
革兰氏阴性 (G-) 菌	400 μg/mL	3~5
革兰氏阳性 (G+) 菌	3 mg/mL	5~10

然后加入350 μL的Buffer GBRL（使用前请确认已加入β-巯基乙醇），涡旋震荡混匀。

【注意】可选步骤：若出现不溶性沉淀，可在步骤5前先将样品于12,000 rpm(~13,400×g) 离心2 min，取上清再继续进行步骤5。

大连美仑生物技术有限公司

官网: <https://www.meilunbio.com/>

电话/邮箱: 0411-62910999 sales@meilunbio.com

本产品仅供科研使用

