

A&DPure 微量细胞/组织总 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

A&DPure 微量细胞/组织总 RNA 提取试剂盒 Cat. No.	5 次样品 A-5001105	50 次制备 A-5001150
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 离心管	5 个	50 个
研磨棒（微量组织选配）	5 个	50 个
蛋白酶 K 贮存液（微量组织选配）	60 μ l	0.6 ml
Carrier RNA	40 μ l	180 μ l
Buffer RLT	4 ml	20 ml
Buffer WA（浓缩液）	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR（浓缩液）	1.5 ml	9.5 ml
RNase-Free Water	1.5 ml	2 ml \times 3
说明书	1 份	1 份

产品储存

- Carrier RNA 与蛋白酶 K 贮存液请于-20 $^{\circ}$ C 储存。
- 其他试剂与物品如果储存于室温（15~25 $^{\circ}$ C），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8 $^{\circ}$ C，可延长产品的有效期至两年以上。

技术支持

艾德科技（北京）有限公司研发部：e-mail: tech@aderr.com 电话：010-57225208。

产品介绍

本产品适合从 $\leq 10^5$ 细胞或 ≤ 5 mg 组织中分离总 RNA。本试剂盒特别添加的 Carrier RNA 能协助需要纯化的 RNA 结合到纯化柱上，提高微量 RNA 的回收效率而不影响 RT-PCR 反应。RNA 结合到纯化柱上后，经两种洗涤液洗去除残留在纯化柱上 PCR 抑制物，总 RNA 用 RNase-Free Water 洗脱，可立即用于 RT-PCR 反应。

用户需自备的试剂与物品

- 14.3 M β -巯基乙醇（ β -mercaptoethanol）、无水乙醇和 70% 乙醇。
- RNase-free 1.5ml 离心管
- 移液器及吸头（为避免 RNA 酶的污染，建议选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
- 一次性手套及防护用品和纸巾
- 台式少量离心机（可配离心 1.5ml 离心管和 2ml 离心管的转子）
- 水浴锅和旋涡震荡器
- 无 RNA 酶使用的实验室

使用前准备

- 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25 $^{\circ}$ C。
- 每 1ml Buffer RLT 中加入 10 μ l 14.3 M β -巯基乙醇和 10 μ l Carrier RNA，混合均匀。加入 β -巯基乙醇的 Buffer RLT 一个月内使用不影响实验结果。
- 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。
- 因为唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，所以 RNA 的提取的全过程都需要戴乳胶手套和口罩。

操作步骤(从细胞中提取微量 RNA):

1. 用 1.5 ml 离心管收集细胞后，轻弹管底使细胞分散开来。加入 300 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇和 Carrier RNA 的 Buffer RLT，直接用吸头吸注细胞 5~10 次，使其全部溶解。

* 如果是从单孔培养（比如 96 孔细胞培养板）的细胞中提取 RNA，请按以下步骤操作：弃尽细胞培养板中的培养液，直接加入 300 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇和 Carrier RNA 的 Buffer RLT，并用吸头对准贴壁生长的细胞来回吸注，使细胞全部溶解。将细胞溶解产物全部转移到一个 1.5ml 离心管中，直接进入步骤 2 操作。

* 如果是悬浮培养的细胞，请按以下步骤收集细胞：300 \times g 离心 5 分钟，弃尽培养液。

2. 加入 300 μ l 70% 乙醇。勿弃吸头，直接用吸头吸注三次混匀，并将混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
3. 吸取混合液加入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2ml 离心管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
4. 弃 2ml 离心管中的滤液，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

5. 弃 2ml 离心管中的滤液，在核酸纯化柱中加入 600 μ l Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

6. 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 RT-PCR 效果。

7. 弃 2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 RNase-free 1.5ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 50 μ l RNase-Free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

9. 弃纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 -70 $^{\circ}$ C 备用。

* 如需要彻底除去 DNA，请用 DNase I 消化残留的 DNA。

操作步骤(从组织中提取微量 RNA):

1. 用手术刀尖将微量组织剁成匀浆状，转移组织到一个1.5 ml离心管中。
 - * 必须将组织颗粒剁成匀浆状，方能缩短组织的溶解时间。
2. 加入150 μ l已经加入了 β -巯基乙醇和Carrier RNA的Buffer RLT,用研磨棒将组织彻底研碎。
3. 向组织溶液中加入290 μ l RNase-Free Water 和10 μ l蛋白酶K贮存液,混合均匀,56 $^{\circ}$ C水浴10分钟,期间漩涡振荡数次帮助组织溶解。
4. 12000 rpm 离心3分钟,吸取400 μ l上清专移到一个洁净的1.5 ml离心管中。
5. 加入250 μ l 无水乙醇。勿弃吸头,直接用吸头吸注三次混匀,并将混合液加入到核酸纯化柱中(核酸纯化柱置于2ml 离心管中),盖上管盖,12000 rpm 离心30秒。
6. 弃2ml 离心管中的滤液,在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA, 盖上管盖,12000 rpm 离心30秒。
 - * 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。
 - * 滤液无须彻底弃尽,如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染,可将 2ml 离心管在纸上倒扣拍击一次。
7. 弃 2ml 离心管中的滤液,在核酸纯化柱中加入 600 μ l Buffer WBR, 盖上管盖,12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。
8. 弃 2ml 离心管中的滤液,将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中,14000 rpm 离心 1 分钟。
 - * 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm, 则用最高速离心 2 分钟。
 - * 请勿省略该步骤, 否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 RT-PCR 效果。
9. 弃 2ml 离心管, 将核酸纯化柱置于一个洁净的 RNase-free 1.5ml 离心管中,在纯化柱的膜中央加入 50 μ l RNase-Free Water, 盖上管盖,室温静置 1 分钟,12000 rpm 离心 30 秒。
 - * 如果离心机没有防泄漏的盖子, 请将离心条件改为 8000rpm 离心 1 分钟, 以免管盖脱落而损伤离心机。
10. 弃纯化柱, 洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验; 或者将 RNA 储存于-70 $^{\circ}$ C备用。
 - * 如需要彻底除去 DNA, 请用 DNase I 消化残留的 DNA。