

A&DPure mi RNA 纯化试剂盒说明书

产品组成

mi RNA 纯化试剂盒	5 次样品	50 次制备
Cat. No.	A-5007005	A-5007050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
Buffer TL	6 ml	55 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×2
说明书	1 份	1 份

产品储存

Buffer TL 请置于 2~8℃ 贮存。

其他物品和试剂如果储存于室温（15~25℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，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

本产品适合从各种不同来源的样本中分离纯化 mi RNA。试剂盒采用柱纯化技术，高效筛选获取高纯度的 small RNA (<200 nt)，适用于 Northern Blot、Dot Blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护和分子克隆等分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇、氯仿
2. 1.5ml 离心管（必须选用 RNase-free 的 1.5 ml 离心管）
3. 移液器吸头（为避免 RNA 酶的污染，请选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
4. 配有 21-25 号针头的注射器
5. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
6. 台式少量离心机（可配离心 1.5ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
7. 旋涡震荡器
8. 不使用 RNA 酶的实验室

使用前准备

- 1) 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
- 2) 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。
- 3) 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：

1) 不同来源样品的处理：

人或动物组织：

在研钵中用液氮将约300~500 mg组织研磨至粉末状，用液氮预冷过的1.5 ml离心管称取50~100mg 人或动物组织，加入1ml Buffer TL。用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8~10次。注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生。

* 尽量在组织粉末尚未融化前加入Buffer TL，以减少组织内源性的RNA酶对RNA的降解。

* 如果组织样品较少(≤100 mg)且不易分散，可先在研钵中加液氮将组织研磨成粉末状，然后直接加1ml Buffer TL至研钵中，再继续研磨约30秒使研钵中的组织溶解到Buffer TL中，吸取匀浆液至一个1.5 ml 离心管中，用装有21-25号针头的注射器反复抽吸8-10次。注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生。

培养的动物细胞：

贴壁培养的细胞：每10cm²培养细胞中加入1ml Buffer TL（比如直径为3.5 cm细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入1ml Buffer TL），勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，吸取匀浆液转移到一个1.5 ml离心管中，进入步骤2)的操作。

悬浮培养的细胞：用1.5 ml离心管离心收集5~10×10⁶细胞，加100μl PBS溶液，漩涡振荡直至细胞全部悬浮，加入1ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，进入步骤2)的操作。

植物组织 / 植物细胞 / 酵母 / 细菌：

在研钵中用液氮将约300~500 mg样品研磨至粉末状，再用液氮预冷的1.5 ml 离心管称取约100 mg研磨成粉末状的组织，加入1ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，进入步骤2)的操作。

2) **可选步骤：**如样品中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或胞外物质（肌肉，植物结节部分等）可于12000×g离心5分钟，取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量DNA，上清中含有RNA。处理脂肪组织时，上层有大量油脂应去除。取澄清的匀浆液进行下一步操作。

3) 加入200 μl氯仿，盖上管盖，用力摇晃15秒，12000×g 离心 15 分钟。

4) 吸取500 μl上层水相，转移到一个洁净的1.5 ml 离心管中，加入215 μl无水乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注三次混匀，将混合液全部转移到过滤柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

5) 弃过滤柱，在滤液中加入540 μl无水乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注三次混匀，吸取650 μl混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

6) 弃2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml 离心管中，将1.5 ml 离心管中剩余的液体全部倒入核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

* 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) 将核酸纯化柱置回到2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入500 μl 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。

8) 弃2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μl 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。

9) 弃2 ml 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实验效果。

10) 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 50 μl 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。

11) 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℃备用。