

## 微量细胞总 RNA 试剂盒说明书

### 产品组成

微量细胞总 RNA 试剂盒	5 次制备	50 次制备
Cat. No.	5004005	5004050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 收集管	5 个	50 个
RNase-free 1.5 ml 收集管	5 个	50 个
Carrier RNA	20 $\mu$ l	180 $\mu$ l
$\beta$ -巯基乙醇	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Buffer RLT	2 ml	18 ml
Buffer WA (浓缩液)	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR (浓缩液)	1.5 ml	10 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml $\times$ 3
说明书	1 份	1 份

### 产品储存

Carrier RNA 请于 -20°C 储存，其他试剂与物品储存于常温（0~30°C），可在两年内保持使用性能无明显变化。

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

### 产品介绍

本产品适合从 $\leq 10^6$ 细胞中分离纯化 $\geq 200$  nt 的 RNA (<200 nt 的 RNA 会被选择性的筛除)，特别添加的 Carrier RNA 能协助微量 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，经两种洗涤液洗去残留在纯化柱上的 PCR 抑制物，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

1. 无水乙醇和 70% 乙醇。
2. RNase-free 1.5 ml 离心管
3. 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）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 无 RNA 酶使用的实验室

### 使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
2. 每 1 ml Buffer RLT 中加入 10  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇，混合均匀。加入 $\beta$ -巯基乙醇的 Buffer RLT 一个月内使用不影响实验结果。
3. 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做好“乙醇已加”的标记。
4. 因为唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，所以 RNA 提取的全过程都需要戴乳胶手套和口罩。

## 操作步骤：

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 3  $\mu$ l Carrier RNA 和 300  $\mu$ l 已经加入了 $\beta$ -巯基乙醇的 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 3  $\mu$ l Carrier RNA 和 300  $\mu$ l 已经加入了 $\beta$ -巯基乙醇的 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 1.5 ml 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。

\* 当细胞量 $\geq 5 \times 10^4$  个时，可不添加 Carrier RNA。

2. 加入 300  $\mu$ 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（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

3. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500  $\mu$ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

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

\* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

4. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600  $\mu$ 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。

5. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，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。

6. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个新的 RNase-free 1.5 ml 收集管中，在纯化柱的膜中央加入 50  $\mu$ 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 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

7. 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  $-70^{\circ}\text{C}$  以下备用。

\* 若需要彻底除去 DNA，请用无 RNase 的 DNase I（Simgen Cat.No. 8003050）消化残留的 DNA。