

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 离心管	5 个	50 个
Carrier RNA	20 μ l	180 μ l
β -巯基乙醇	50 μ l	500 μ 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 $^{\circ}$ C 储存。
- 其他试剂与物品如果储存于常温 (0~30 $^{\circ}$ 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

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 $\leq 10^5$ 细胞中分离总 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，经两种洗涤液洗去残留在纯化柱上的 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

- 无水乙醇和 70% 乙醇。
- RNase-free 1.5 ml 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
- 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
- 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 1 ml Buffer RLT 中加入 10 μ l 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做好“乙醇已加”的标记。
- 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1.5 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。

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（核酸纯化柱置于2 ml离心管中），盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

3. 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500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2 ml离心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 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。

5. 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，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离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的RNase-free 1.5 ml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 $^{\circ}$ C以下备用。

* 若需要彻底除去DNA，请用无RNase的DNase I消化残留的DNA。