

A&DPure 培养细胞总 RNA 提取试剂盒(无 DNase I)说明书

产品组成

A&DPure 培养细胞总 RNA 提取试剂盒(无 DNase I) Cat. No.	5 次样品 A-5004005	50 次制备 A-5004050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
Buffer RLT	4 ml	32 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 × 3
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

试剂盒如果储存于室温（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

本产品不涉及酚氯仿的使用，适合从 $\leq 1 \times 10^7$ 培养细胞中分离纯化总 RNA。培养细胞经裂解液溶解后释放 RNA，补加乙醇后加入纯化柱，RNA 结合在纯化柱上，溶解的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去。RNA 经两种洗液洗涤后，用 RNase-Free Water 洗脱，即可用于 RT-PCR，Northern blot，Dot blot，mRNA 分离等各种分子生物学实验。

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
- 台式小量离心机（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

- 1) 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
- 2) 每 1ml Buffer RLT 中加入 10 μ l 14.3 M β -巯基乙醇，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。
- 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作好“乙醇已加”的标记。
- 4) 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. 在 1.5 ml 离心管中收集 $\leq 1 \times 10^7$ 培养细胞，用手指轻弹管壁，使细胞分散开来。

*细胞收集方法：

a) 悬浮培养的细胞：300×g 离心 5 分钟收集约 1×10^7 培养细胞，弃上清液。

b) 贴壁培养的细胞：弃培养上清，用胰酶消化并悬浮细胞，300×g 离心 5 分钟收集约 1×10^7 培养细胞，弃胰酶上清液。

c) 细胞培养板中单孔培养的细胞（如果单孔细胞数 $\leq 1 \times 10^5$ 时，请选用 A&DPure 微量细胞/组织总 RNA 纯化试剂盒：Cat. No.: A-5001150）：弃培养上清，直接加入 600 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇的 Buffer RLT，并用吸头来回吸注数次细胞使细胞溶解，直接进入步骤 3 操作。

2. 加入 600 μ l 已经加入了 β -巯基乙醇的 Buffer RLT，旋涡振荡直至细胞全部溶解，溶液呈透明状。

* 勿使用过多的细胞，否则可能堵塞过滤柱并导致最后纯化的 RNA 基因组 DNA 污染严重。

3. 将细胞溶解物全部转移到过滤柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 2 分钟。

* 勿省略本步骤，否则可能导致后续的操作步骤中堵塞纯化柱。

* 如果此步骤有液体过滤不尽，则说明使用了过多的细胞。在步骤 4 可加入与滤液等体积的 70% 乙醇继续操作，其他步骤不变。

4. 弃过滤柱，向滤液中加入 600 μ l 70% 乙醇并用吸头吸注 6~8 次混合均匀，吸取 600 μ l 混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

5. 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，吸取剩余的混合液加入到核酸纯化柱中，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 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。

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，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

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，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 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 50~100 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。

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°C 备用。

* 即使电泳检测可能观察不到 DNA 条带，也不代表纯化的 RNA 中不含 DNA 的污染，如需要彻底除去 DNA，请用 DNase I 消化残留的 DNA。