

A&DPure 动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

A&DPure 动物组织总 RNA 提取试剂盒	5 次样品	50 次制备
Cat. No.	A-5001005	A-5001050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
Buffer RLT	4 ml	32 ml
Buffer RDD	250 μ l	2.5 ml
DNase I	28 μ l	270 μ l
Buffer WA（浓缩液）	3.8 ml	24 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

产品储存与有效期

DNase I 请置于-20℃贮存。

其他试剂和物品如果储存于室温（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 ≤ 30 mg 组织中分离纯化总 RNA。组织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
- 移液器及移液器吸头（必须选用 RNase-free 的移液器吸头，推荐使用含有滤芯的 DNase-free & RNase-free 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）
- 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) 因唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在 RNA 的提取的全过程中都戴乳胶手套和口罩。

操作步骤：

1. 在研钵中加入约200~400 mg切成碎屑的动物组织和液氮，将组织研磨至粉末状，再用液氮预冷的1.5 ml离心管称取20~30 mg研磨成粉末状的组织。

* 研磨组织时应及时补加液氮，避免组织融化，以免内源性的RNA酶恢复活性而降解RNA。

* 勿使用超过30 mg组织，否则可能导致过滤柱堵塞，并使纯化的RNA中混有基因组DNA污染。

2. 加入600 μ l已经加入了 β -巯基乙醇的Buffer RLT，旋涡振荡直至组织全部溶解，溶液呈半透明状。

* Buffer RLT具腐蚀性，请戴防护用品进行操作。

3. 将组织的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。

* 如果溶解物不能全部滤过过滤柱，说明组织中核酸含量过高。此时应吸取300 μ l滤液转移到一个洁净的1.5 ml离心管中，再加300 μ l 70%乙醇到1.5 ml 离心管中并用吸头吸注6~8次混合均匀，然后将全部混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心1分钟。过滤柱及残余的滤液则丢弃不用，然后直接进入步骤6的操作。

4. 弃过滤柱，向滤液中加入600 μ l 70%乙醇并直接用吸头吸注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。

* 加入70%乙醇混合后如果有沉淀产生，请将沉淀一起加入到核酸纯化柱中。

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。丢弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. 取 5 μ l DNase I 加入到一个洁净的 1.5 ml 离心管管底，再加入 45 μ l Buffer RDD，勿弃吸头，直接用移液器温和地吹打几次混合均匀，将混合液全部加入纯化柱的膜中央，室温静置(20~30℃)15 分钟。

8. 加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

9. 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中。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。

10. 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。

11. 弃 2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 RNase-free 的 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，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 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 1.5ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

12. 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。