

RaPure Universal RNA Plus Kit

总 RNA 小提带酶试剂盒

本产品适合于从 $\leq 1 \times 10^7$ 个培养细胞、 $\leq 20\text{mg}$ 动物软组织(肝脏、脾脏、肾脏, 脑等)、 $\leq 100\text{mg}$ 常规的植物/真菌组织样品中提取总 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术, 提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提, 整个提取过程只需 15~25 分钟。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern Blot、Poly A 纯化, 核酸保护和体外翻译等实验。

产品组份

产品编号	R4013-01	R4013-02	R4013-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	5 x 100
DTT Powder	46 mg	180 mg	1 g
DNase I	120 μl	600 μl	5 x 600 μl
DNase Buffer	1 ml	6 ml	30 ml
Buffer PRL	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RPS	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml

版本号: 2018-08

保存条件

本产品除 DNase 外, 可以在室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$)保存 18 个月, 长期保存时需置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。DNase I/DNase Buffer, 以及 DTT 干粉采用 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 运输, 收到产品后, 把 DNase/DNase Buffer/DTT 保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。低温下, Buffer PRL 可能会有沉淀形成, 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴让沉淀完全溶解。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- DTT 的溶液：加入 300ul (10 次)、1200ul(50 次)、6ml (250 次) RNase Free Waer 至 DTT 干粉中，颠倒混匀使之充分溶解，然后保存于-20℃。
- (可选)：使用前，分装适量的 Buffer PRL，每 1ml Buffer PRL 加入 20ul 1M DTT。Buffer PRL/DTT 混合液可室温放置 1 个星期。

实验步骤

A. 细胞(5×10^6)的收集和裂解:

1. **加入 500ul Buffer PRL 至细胞样品中，打散细胞。**
悬液细胞：500 x g 离心 5 分钟收集细胞，去除培养液弹打或涡旋松散细胞沉淀，加入 500ul Buffer PRL，涡旋打散细胞。
贴壁细胞：用胰酶处理或刮取式得到细胞悬液，500 x g 离心 5 分钟收集细胞，去除培养液，松散细胞沉淀，加入 500ul Buffer PRL，吸打打散细胞。
2. 匀浆：处理小于 2×10^6 细胞时，用 1ml 移液枪抽打裂解液 6~10 次；处理大于 2×10^6 细胞时，用小号注射器(20 号针头)反复抽打 5~6 次打断 DNA，降低溶液的粘稠度。
3. **加入 500ul Buffer RPS 至样品中，涡旋混匀 15 秒，(可选)70℃ 水浴 3 分钟。**
4. 13,000 x g 离心 5 分钟。
5. **转移上清液至新的离心管中，加入 0.5 倍体积无水乙醇至上清液中，用移液枪吸打 4~5 次。按第 5 步进行操作。**
若需要小分子 RNA，加入等倍体积的异丙醇。

B. 动物和植物真菌样品的裂解:

1. **称取组织样品，选择合适的工具进行匀浆，加入 500ul Buffer PRL 进行裂解。**
 - 普通软组织(肝/肺/肾/脑等) <math><20\text{mg}</math>: 加入 500ul Buffer PRL;

- 富含肌纤维样品(肌肉/皮肤等)<40mg: 加入 500 μ l Buffer PRL;
- 特殊动物脾脏(5~10mg): 加入 500 μ l Buffer PRL;
- 植物/真菌 50~100mg: 加入 500 μ l Buffer PRL;

注: 用玻璃或机械匀浆器匀浆时, 放置于冰上进行匀浆, 用匀浆器时, Buffer PRL 要多加 20~30%, 以确定匀浆后可获得 500 μ l。若液氮研磨, 将粉末迅速转移至 1.5ml 离心管中, 待液氮挥发后, 加入 500 μ l Buffer PRL, 用移液枪反复吸打至裂解液无明显的颗粒。处理植物/真菌样品时, 高速涡旋混匀至样品充分打散。处理复杂的多酚类植物/真菌样品时, 加入 PVP-40 至 Buffer PRL 中, 终浓度为 2%(W/V), 可以提高成功率。

2. 加入 500 μ l Buffer RPS 至样品中, 涡旋混匀 15 秒, (可选)70°C 水浴 3 分钟。
3. >13,000 \times g 离心 5 分钟。离心后, 如果在上清液表面形成一层固体状物时, 只要在吸取上清前用枪头将固体状物拨到离心管一边即可。
4. 转移上清液至新的离心管中, 加入 0.5 倍体积无水乙醇至上清液中, 用移液枪吸打 4~5 次。按第 5 步进行操作。
若需要小分子 RNA, 加入等体积的异丙醇。

C. 细菌:

1. 选择合适条件过夜培养细菌, 第二天, 按 1:50 的比例接种至新培养基中培养 6~8 小时, 如果生长太慢, 可以加大接种量。取 1ml 培养液至 1.5ml 离心管中, 13,000 \times g 离心 2 分钟, 除去上清, 留下细菌沉淀。加入 100 μ l Buffer TE/Lysozyme(3mg/ml)到细菌沉淀中, 轻轻敲打重悬细菌, 室温孵育 5~10 分钟。
2. 加入 400 μ l Buffer PRL, 用移液枪反复吸打 6~10 次, 室温放置 5~10 分钟。
3. (可选)处理难裂解细菌时, 加入~200mg 玻璃珠(0.1~0.2mm), 高速涡旋 5~10 分钟的进一步裂解细菌, 静置 1 分钟后, 转移上清至 1.5ml 离心管中。
4. 加入 0.5 倍无水乙醇至裂解液中, 用移液枪吸打 4~5 次。按第 5 步进行操作。

过柱纯化 RNA

5. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq 750\mu\text{l}$ 混合液至柱子中。
12,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. (可选:混合液超过 750 μl) 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 350 μl Buffer RW1 至柱子上。12,000 \times g 离心 60 秒。
8. 把 RNA 柱装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液并混匀。把 DNase I 反应液加到 RNA 柱的膜中央, 室温静置 20~30 分钟。

成分	用量
DNase Buffer	70 μl
DNase I (20Units/ μl)	10 μl

9. 加入 500 μl Buffer RW1 至柱子上, 室温放置 5 分钟, 12,000 \times g 离心 60 秒。
10. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 500 μl Buffer RW2 至柱子上, 12,000 \times g 离心 30~60 秒。
11. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 500 μl Buffer RW2 至柱子中, 12,000 \times g 离心 30~60 秒。
12. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心 2 分钟。
13. 将柱子转移至 1.5ml 离心管, 加入 30~100 μl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 弃去柱子, 把 RNA 保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 。