

HiPure Total RNA Plus Mini 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	R4121-01	R4121-02	R4121-03
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
DNase I	120 ul	600ul	5 x600ul
DNase Buffer	1 ml	6 ml	30 ml
RTL Lysis Buffer	10 ml	50 ml	220 ml
RNA Binding Buffer*	3 ml	15 ml	75 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: 2018-01

保存条件

本产品可在室温(15-25°C)保存 18 个月, 长期保存时需置于 2-8°C。DNase I 采用室温运输, 收到产品后, 把 DNase I 保存于-20~8°C。低温下, RTL Lysis Buffer 可能会有沉淀形成, 55°C 水浴让沉淀完全溶解。

准备事项

- 在 RNA Binding Buffer 中，按标签所示加入适量的无水乙醇，于室温保存。

实验步骤

A. 培养细胞的收集和裂解:

本产品单次可处理 $10^2 \sim 10^7$ 个细胞。初次使用时，建议使用 2×10^6 个细胞。根据结果再调整细胞量。但不论何种情况，细胞量不要超过 1×10^7 。

1. 加入适量的 RTL Lysis Buffer 至细胞样品中，打散细胞。

离心收集的细胞：弹打或涡旋松散细胞沉淀，根据细胞量加入适量的 RTL Lysis Buffer，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

直接裂解：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入适量的 RTL Lysis Buffer。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，转移至 1.5ml 离心管中。

- $\leq 5 \times 10^6$ 细胞/6 cm 直径的培养皿：加入 350 μ l RTL Lysis Buffer；
- $\geq 5 \times 10^6$ 细胞/6-10cm 直径的培养皿：加入 700 μ l RTL Lysis Buffer；

2. 用小号注射器抽打裂解液 5~10 次打断 DNA，按第 3 步进行操作。

为减少 DNA 污染，这一步最好用小号注射器(1ml)反复吸打几次。

B. 组织样品的裂解:

本产品单次可处理 ≤ 20 mg 动物软组织或 ≤ 100 mg 植物组织。正确组织量是获得理想产量和纯度的关键。过多的组织量会造成 DNA 消化不彻底。肝脏 10mg，脾脏/胸胰小于 10mg，植物组织 30~100mg。初次使用时，推荐起始动物组织量为 10mg，植物用量为 30~50mg。根据结果再调整用量。样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器、珠磨仪等工具进行匀浆。

1. 称取组织样品，选择合适的工具进行匀浆，加入适量的 RTL Lysis Buffer。

- ≤ 10 mg：加入 500 μ l RTL Lysis Buffer；
- > 10 mg：加入 750 μ l RTL Lysis Buffer；
- ≤ 20 mg 难裂解组织(肌肉/皮肤)：用 500~700 μ l RTL Lysis Buffer 匀浆肌肉类组织样本。取 500 μ l 匀浆液，加入 250 μ l RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K(自配)，颠倒混匀，55 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。

2. 室温下，14,000 x g 离心 5 分钟。按第 3 步进行操作。

过柱纯化 RNA

3. 加入等倍体积的 RNA Binding Buffer 至裂解液或上清液中，用移液枪吸打 3~10

次。若出现明显沉淀，用移液枪吸打多次尽量打散沉淀。

4. 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。
5. (可选:混合液超过 $750\mu\text{l}$) 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。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 $300\mu\text{l}$ Buffer RW1 至柱子上。 $12,000 \times g$ 离心 2 分钟。
7. 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($15\text{-}30^\circ\text{C}$)静置 20~30 分钟。

成分	用量
DNase Buffer	$70\mu\text{l}$
DNase I($20\text{Units}/\mu\text{l}$)	$10\mu\text{l}$

8. 加入 $500\mu\text{l}$ Buffer RW1 至柱子上，静置 3 分钟。 $12,000 \times g$ 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 $500\mu\text{l}$ Buffer RW2 至柱子中， $12,000 \times g$ 离心 30~60 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 $500\mu\text{l}$ Buffer RW2 至柱子中， $12,000 \times g$ 离心 30~60 秒。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。 $12,000 \times g$ 离心 2 分钟。
12. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 $20\text{~}80\mu\text{l}$ 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。弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C 。
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 $20\mu\text{l}$ ，若 RNA 产量超过 $30\mu\text{g}$ ，推荐进行第二次洗脱。本产品只回收 $>200\text{nt}$ 的 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA 和 rRNA 等，在纯化过程中被去掉，可起到富集 mRNA 的作用。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量，超量的组织或细胞反而会降低产量和纯度。

- **样品富含肌纤维:** 肌肉、心脏、皮肤以及一些低等小型生物含肌纤维，肌纤维分子量太大会引起柱子堵塞。建议用 HiPure Fibrous RNA Kit。或订购 Proteinase K，按难裂解组织进行抽取。
- **样品富含脂类物质:** 脑，脂肪富含脂类物质，推荐用 HiPure Universal RNA Kit。
- **富含多糖类样品:** 处理富含多糖的组织，推荐用 HiPure Plant RNA Kit。
- **裂解液离心不充分:** 组织裂解液需高速离心去除杂质。细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些样品时，离心后裂解液表面还可能会有一层脂类层，转移上清液尽量不要吸到这些物质。
- **裂解液非常粘稠:** 加大裂解液用量，并用一次性注射器抽打裂解液 5~10 次。

2. RNA 降解

- **RNase Free Water 被污染:** RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的 RNase Free Water 或 DEPC 处理水。
- **提升 RTL Lysis Buffer 的变性 RNASE 的能力:** 使用前分装适量的 RTL Lysis Buffer，按每 ml RTL Lysis Buffer 加入 20 μ l β -巯基乙醇或 2M DTT，混合液室温可保存 1 周。由于 β -巯基乙醇/DTT 的毒性，多数情况下，不添加也可以得到完整的 RNA。
- **样品贮藏问题:** 反复解冻会引起 RNA 降解，确保样品解冻次数不要超过 2 次。
- **裂解问题:** 样品在解冻前，需要在 RTL Lysis Buffer 中快速匀浆。样品只能充分裂解后，内源的核酸酶才能被灭活，RNA 才不会降解。
- **电泳原因:** 常见的 RNA 降解现象都是电泳过程中引起的，更换新的 Loading Buffer 和电泳缓冲液。

3. DNA 的污染

- **DNase I 消化:** 减少样品用量，或用 DNase I 进行第二次消化。

4. RNA 产量低

- **洗脱不充分:** RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置几分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。
- **样品用量太多:** 减少样品用量，超量的样品有时会引起产量下降。