

HiPure Total RNA Mini Kit

总 RNA 小提试剂盒(双柱型)

产品简介

本产品适合于从 $\leq 1 \times 10^7$ 个培养细胞、 $\leq 30\text{mg}$ 动物软组织(肝脏、脾脏、肾脏, 脑等)、 $\leq 200\text{mg}$ 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。试剂盒结合DNA过滤技术, 可高效地过滤去除DNA。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	R4111-01	R4111-02	R4111-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	10 ml	50 ml	250 ml
Reagent DX	0.5 ml	0.5 ml	1.5 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
说明书	1	1	1

保存条件

本产品可在室温(15~25°C)保存 18 个月。因 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, 推荐分装保存于 2~8°C, 以减少污染。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 70%乙醇(DEPC 处理水配制)
- Reagent DX: 每 1ml Buffer RL 加入 5 μ l Reagent DX，能有效消除匀浆过程产生的泡沫。
- 提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 Buffer RL，按每 1ml Buffer RL 加入 20 μ l β -巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP，混合液室温可保存 1 周。TCEP，中文名为三(2-羧乙基)膦盐酸盐，是一种高效、无异味、不含硫醇基还原剂，可高效灭活核酸酶和防止多酚氧化，可代替 2-巯基乙醇，提高 RNA 的完整性和得率。

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 $2\sim 5 \times 10^6$ 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 Buffer RL 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 Buffer RL，涡旋或用移液枪拍打打散细胞。

- $\leq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 350 μ l Buffer RL；
- $\geq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 750 μ l Buffer RL；

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 Buffer RL。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，转移至 1.5ml 离心管中。

- 6 cm 直径的培养皿：加入 350 μ l Buffer RL；
- 6-10 cm 直径的培养皿：加入 750 μ l Buffer RL；

2. 用一次性 1ml 注射器或移液枪抽打裂解液 5~10 次打断 DNA，按第 3 步进行操作。

B. 组织样品的裂解

本产品可处理 <30mg 动物组织、50~100mg 植物组织。正确组织量是获得理想产量和纯度的关键。肝脏 10~20mg，脾脏/胸腺小于 10mg，植物 50~100mg。初次使用时，推荐动物组织量为 10~15mg，植物为 50~100mg。根据结果再调整用量。处理肌纤维样品(肌肉/皮肤/心脏)，需另外订购 Proteinase K(20mg/ml)。处理富含脂类组织推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器等工具进行匀浆。

1. 取组织样品，加入 Buffer RL，用合适工具进行匀浆，室温静置 3~5 分钟。

- ≤ 10 mg 动物软组织：加入 400 μ l Buffer RL 进行匀浆；

- >10mg 动物软组织：加入 750 μ l Buffer RL 进行匀浆；
- \leq 30mg 难裂解组织(肌肉/皮肤)：用 500~700 μ l Buffer RL 匀浆肌肉类组织，取 500 μ l 匀浆液，加入 200 μ l RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K(需另外订购)，颠倒混匀 6-8 次，55 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。
- \leq 100mg 植物样品：用液氮将植物或真菌研磨成粉末，取 50~100mg 粉末至 1.5~2.0ml 预冷的离心管中，立即加入 750 μ l Buffer RL，涡旋 15 秒打散样品，室温静置 3 分钟。

2. 14,000 \times g 离心 5 分钟。按第 3 步进行操作。

过柱去除 DNA

3. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。把细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中。14,000 \times g 离心 2 分钟。
4. 丢弃 gDNA 过滤柱。加入等体积 70%乙醇至滤液中，用移液枪吸打 3~5 次。处理肝脏和脾脏时，用 50%乙醇代替 70%乙醇可以提高产量。

过柱纯化 RNA

5. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 \leq 750 μ l 混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
6. (可选:混合液超过 750 μ 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 1 分钟。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 μ l Buffer RW1 至柱子。12,000 \times g 离心 1 分钟。若需彻底去除 DNA 污染，建议用 DNase on Column Kit(R4911)进行膜上 DNase 消化。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 μ l Buffer RW2 至柱子。12,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 μ l Buffer RW2 至柱子。12,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心 2 分钟。
11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30-100 μ 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 $^{\circ}$ C。

当 RNA 总量高于 10 μ g 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 μ g 时，A260/230 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3 μ g，A260/230 会低于 0.6。这是因为 Buffer RTL、RW1 含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值，因此 A260/230 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研究表明，低浓度异硫氰酸胍不影响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，可以忽略并直接

用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下，适量提高样品用量和裂解液用量，提高核酸浓度（核酸总量>10ug）时，OD260/230 可以明显改善。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多**：减少样品量，过量组织或细胞反而会降低产量和纯度。
- **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。
- **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 Buffer RL 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。
- **70%乙醇有问题**：用 DEPC 处理水配制 70%乙醇，或用 Buffer RW2 代替。

3. DNA 的污染

- **DNase I 消化**：gDNA 过滤柱可去除 95-99%的 DNA 污染。DNA 去除效果取决样品类型和用量。若纯化的 RNA 用于 RT-PCR，建议订购我司的 DNase on Column Kit 进行膜上 DNase 消化以彻底去除 DNA。

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。处理肝脏或脾脏样品，用 50%乙醇代替 70%乙醇。