

HiPure Total RNA Plus Mini Kit

总 RNA 小提带酶试剂盒

产品简介

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 μl	600 μl	5 x 600 μl
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: 2024

保存条件

本产品可在室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$)保存 18 个月。DNase I 采用室温运输, 收到产品后, 把 DNase I 保存于-20~-8 $^{\circ}\text{C}$ 。低温下, RTL Lysis Buffer 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 RNA Binding Buffer 中，按标签所示加入适量的无水乙醇，于室温保存。
- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 RTL Lysis Buffer，按每 1ml RTL Lysis Buffer 加入 20 μ l β -巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP (货号 C175)，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

本产品一次可处理 10^2 ~ 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 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。

- $\leq 2 \times 10^6$ 细胞：加入 350 μ l RTL Lysis Buffer；
- $> 2 \times 10^6$ 细胞：加入 700 μ l RTL Lysis Buffer；

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。用移液枪敲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 RTL Lysis Buffer；
- 6-10cm 直径的培养皿：加入 700 μ l RTL Lysis Buffer；

2. 用一次性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。

为减少 DNA 污染，这一步最好用小号注射器(1ml)反复吸打 3-5 次。

B. 组织样品的裂解

本产品一次可处理 1~20mg 动物软组织、10~100mg 植物组织。正确组织量是获得理想产量和纯度的关键。肝脏 10mg，脾脏/胸胰小于 5mg，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 50mg。根据结果再调整用量。处理含肌纤维样品，如肌肉、皮肤、心脏，推荐使用 HiPure Fibrous RNA Kit。处理富含脂类的组织推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器、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 动物软组织：加入 400 μ l RTL Lysis Buffer；

- >10mg 动物软组织：加入 750 μ l RTL Lysis Buffer；

2. 室温，14,000 \times g 离心 5 分钟。转移上清至新离心管中，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 5~10 次。处理肌肉、皮肤或心脏等肌纤维含量高的样品，再加入 20 μ l Proteinase K (20mg/ml, 自备)，颠倒混匀 6-8 次，室温静置 10-15 分钟，消化大分子量的肌纤维分子，可以防止堵塞柱子。
4. 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 30~60 秒。
5. (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 30~60 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 300 μ l Buffer RW1 至柱子上。12,000 \times g 离心 2 分钟，丢去滤液和柱子。
7. 把 RNA 柱装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液，混匀。

成分	用量
DNase Buffer	100 μ l
DNase I(20Units/ μ l)	10 μ l

8. 把全部的 DNase I 反应液滴加到柱子膜中央，盖上盖子，正放 5 分钟，然后再把柱子反放于桌面，让 DNase 反应液尽量覆盖于膜的表面（大部分的 DNA 在膜表面），室温静置 10~15 分钟消化去除 DNA。
9. 加入 500 μ l Buffer RW1 至柱子上，静置 2 分钟。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 μ l Buffer RW2 至柱子中，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 μ l 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 20~80 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。
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 20 μ l，若 RNA 产量超过 30 μ g，推荐进行第二次洗脱。本产品只回收 >200nt 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。

当 RNA 总量高于 10ug 时, OD260/230 一般都在 1.3-2.2; 当 RNA 总量在 5~10ug 时, A260/230 会在 1.0~2.0; 当 RNA 总量低于 3ug, A260/230 会低于 1。这是因为 Buffer RTL 和 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 主要受试剂中胍盐影响, 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, 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 HiPure Fibrous RNA Kit 说明书进行抽提。
- **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 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。

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。