

## HiPure Total RNA 96 Kit

96 孔 RNA 提取试剂盒

### 产品简介

本产品适合于从 $\leq 5 \times 10^6$ 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。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	R4116-01	R4116-02	R4116-03
纯化次数	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
HiPure RNA Plate	1	4	20
gDNA Filter Plate	1	4	20
1.6 ml Collection Plate	1	4	20
0.5ml Elute Plate	1	4	20
封口膜	2	8	40
Buffer RL	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Reagent DX	0.1 ml	1.5 ml	6 ml
Buffer RW1	100 ml	350 ml	3 x 500 ml
Buffer RW2*	50 ml	2 x 100 ml	10 x 100 ml
RNase Free Water	15 ml	60 ml	250 ml
说明书	1	1	1

### 保存条件

本产品可在室温(15~25℃)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℃,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 $\mu$ 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 $\mu$ l  $\beta$ -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。

## 方案. 细胞和动物软组织总 RNA 高通量提取

该方案采用 96 孔 RNA 结合板和 96 孔 gDNA 过滤板，可高通量地从 96 个  $\leq 5 \times 10^6$  个培养细胞和  $< 20\text{mg}$  动物软组织，如肝脏、脾脏、肾脏等样，以及  $\leq 100\text{mg}$  常规的植物/真菌组织样品中提取高达 100 $\mu\text{g}$  总 RNA。以下离心均在室温下进行。

### A. 培养细胞的收集和裂解[1~5 $\times 10^6$ 个细胞]。

#### 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，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

- $\leq 5 \times 10^6$  细胞：加入 500 $\mu$ 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 500 $\mu$ l Buffer RL；

#### 2. 涡旋混匀或最高速度振荡混匀 1 分钟，然后按第 3 步进行操作。

### B. 组织样品的裂解

正确的组织用量是获得理想 RNA 产量和纯度的保证。该试剂盒的组织用量可低至 0.1mg，而最大的组织用量则取决于样品中 RNA 的含量、蛋白质和杂质的含量。

- 肝脏含有大量蛋白质，组织用量  $\leq 10\text{mg}$ ；
- 脾脏、胸胰组织含大量 DNA，裂解液非常粘稠，组织用量能太多  $\leq 10\text{mg}$ ；

若处理的组织没有相关的信息，我们推荐第一次起始用量为 10mg，根据获得的结果再调整组织用量。不管何种情况，组织用量都不应超过 20mg。

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。**
  - ≤20mg 动物软组织：加入 500µl Buffer RL 进行匀浆；
  - ≤20mg 难裂解组织(肌肉/皮肤)：用 400µl Buffer RL 匀浆肌肉类组织。取 350µl 匀浆液，加入 150µl RNase Free Water 和 20µl Proteinase K(需另外订购)，颠倒混匀 6-8 次，55℃温育 10 分钟。
  - ≤100mg 植物样品：用液氮将植物或真菌研磨成粉末，取 10~100mg 粉末至 1.5~2.0ml 预冷的离心管中，立即加入 550µl Buffer RL，涡旋 15 秒打散样品，室温静置 3 分钟。
2. **14,000 x g 离心 5 分钟，按第 3 步进行操作。**
3. **把 gDNA Filter Plate 装在 2ml 收集板中，把 500µl 细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟，丢弃 gDNA 过滤板。**
4. **加入等倍体积 70%乙醇至滤液中，贴上封口膜，颠倒混匀 6-8 次，短暂离心收集孔口的液滴。**

操作过程中裂解液可能有损失，70%乙醇应按照裂解液的实际体积加入。处理肝脏样品时，用 50%乙醇代替 70%乙醇有利于提高产量。
5. **把 HiPure RNA Plate 在 1.6ml 收集板中。转移全部混合液至 RNA 结合板中。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。**
6. **把 RNA 结合板装在 1.6ml 收集板中。加入 700µl Buffer RW1 至结合板中。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。**
7. **把 RNA 结合板装在 1.6ml 收集板中。加入 700µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中，4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。**

Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
8. **把 RNA 结合板装在 1.6ml 收集板中。加入 700µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。**
9. **把 RNA 结合板装在 2ml 收集板中，4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟以甩干柱子的基质。**

10. 把 RNA 结合板装在 0.5ml 收集板中，加入 60 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。
11. 再加入 60 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。4,000~5,000 rpm 离心 5 分钟。
12. 弃去 RNA 结合板，贴上封口膜，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

HiPure Total RNA 96 Kit 只能结合大于 200nt 的总 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA，tRNA 以及其它小分子 RNA，在纯化过程中被去掉，可起到富集 mRNA 的作用。使用试剂盒得到的 RNA 产量，因不含小分子 RNA，比起其它方法(如 Trizol)的获得的 RNA，产量会低 15-20%。

当 RNA 总量高于 10 $\mu$ g 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 $\mu$ g 时，A260/230 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3 $\mu$ g，A260/230 会低于 0.6。这是因为 Buffer RTL、RV1 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>10 $\mu$ g)时，OD260/230 可以明显改善。