

RaPure Total RNA Micro Kit

微量 RNA 提取试剂盒

产品简介

本产品适合于从 $<1 \times 10^6$ 培养细胞、 $<5\text{mg}$ 动物软组织、 $<30\text{mg}$ 植物组织等微量组织细胞样品中提取总 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，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 20 分钟。纯化的 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	R4012-01	R4012-02	R4012-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
RTL Lysis Buffer	10 ml	20 ml	120 ml
RNA Binding Buffer*	3 ml	15 ml	2 x 15 ml
Carrier RNA	120 μg	310 μg	3 x 310 μg
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	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。Carrier RNA 干粉室温运输和保存，收到产品后把 Carrier RNA 保存于 8~20°C。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，按标签所示加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 在 RNA Binding Buffer 中，按标签所示加入适量的无水乙醇，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，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。
- 加入适量的 RNase Free Water 至 Carrier RNA 管子中至终浓度为 1 μ g/ μ l，涡旋让 Carrier RNA 充分溶解，然后保存于-20 $^{\circ}$ C。

Carrier RNA 作用

- 若处理小于 100 μ g 动植物组织或<1000 个细胞时，Carrier RNA 须加到 RTL Lysis Buffer 中至终浓度为 4ng/ μ l。Carrier RNA 起着两个作用。首先，Carrier RNA 能提高微量的 RNA 的回收效率；其次是起保护 RNA 的作用。
- 按 Carrier RNA:RTL Lysis Buffer =1:250 比例混合。该混合液可在 2-8 $^{\circ}$ C 稳定放置 2 天。举例：加入 4 μ l Carrier RNA 至 1ml RTL Lysis Buffer 中。由于 Carrier RNA 为 Poly A 结构，可能会影响到 RT-PCR 的灵敏度，建议根据结果进行调整。添加了 Carrier RNA 进行提取时，测量 OD 时，核酸浓度不代表真实样品浓度，而且 A260/280 会超过 2.0，一般在 2.5-2.8。

实验步骤

A. 培养细胞 (<1 \times 10⁶)：计算细胞数量，加入适量 RTL Lysis Buffer 至样品中。

离心收集的细胞：弹打或涡旋使细胞松散，然后加入适量的 RTL Lysis Buffer。涡旋或吸打混匀。

- \leq 1 \times 10⁶ 细胞：加入 350 μ l RTL Lysis Buffer，用一次性的注射器抽打裂解液 5 次；
- \leq 1 \times 10⁵ 细胞：加入 100 μ l RTL Lysis Buffer，高速涡旋 1 分钟；

贴壁细胞的直接裂解：彻底吸弃培养液后，往培养瓶/皿中加入适量的 RTL Lysis Buffer。用枪吹打使细胞从壁上脱落，收集裂解液，并转移至离心管中。

- 6cm 培养皿：加入 350 μ l RTL Lysis Buffer，用一次性的注射器抽打裂解液 5 次；
- 处理 \leq 1 \times 10⁵ 细胞的多孔板：加入 100 μ l RTL Lysis Buffer，用移液器吸打 5 次；

- B. 动物组织(<5mg):** 把样品置于离心管中, 加入 350 μ l RTL lysis Buffer 进行匀浆。
选择合适的匀浆工具进行匀浆, 处理<100 μ g 组织时, 只需高速涡旋 1 分钟。室温下, 14,000 \times g 离心 3 分钟。转移上清液转移至新的 1.5ml 离心管中。
- C. 植物或真菌 (<30mg):** 转移微量植物或真菌样品至 1.5ml 离心管中, 用研磨杵和液氮将样品研磨成粉末状, 加入 350 μ l RTL lysis Buffer 至样品中, 涡旋 15~30 秒。室温下, 14,000 \times g 离心 5 分钟。小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。

第二部分: 过柱纯化

- 加入等倍体积 RNA Binding Buffer 至细胞裂解液或组织上清液中, 涡旋混匀 5~10 秒。
- 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移全部的混合液(包括沉淀)至柱子中。10,000 \times g 离心 30 秒。
若需彻底去除基因组 DNA 污染, 按第 3 步进行操作。若不需去除基因组 DNA 污染, 按第 4 步进行操作。
- (可选)彻底去除 DNA(DNase Set, R4911-01B 需另外订购)
 - 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 300 μ l Buffer RW1 至柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。
 - 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。按下表配制 DNase 反应液, 混匀。

成分	体积
Digestion Buffer	50 μ l
DNase I	10 μ l

- 把 DNase 反应液加至结合柱的膜中央, 室温静置 15 分钟。
- 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RW1 至柱子上, 静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 30 秒。
- 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中, 10,000 \times g 离心 30 秒。
- 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中, 10,000 \times g 离心 30 秒。
- 倒弃流出液, 把柱子装回收集管。10,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。

8. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 10~30 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央，静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。丢去 RNA 柱，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。

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。
- **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。

3. 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。