

HiPure Total RNA Micro Kit

微量 RNA 提取试剂盒(双柱型)

产品简介

本产品适合于从 $\leq 1 \times 10^6$ 个培养细胞、 $\leq 5\text{mg}$ 动物软组织(肝脏、脾脏、肾脏, 脑等)、 $\leq 30\text{mg}$ 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	R4114-01	R4114-02	R4114-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mico Columns	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	10 ml	30 ml	120 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Carrier RNA	120 μg	310 μg	3 x 310 μg
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。
- 提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 RTL Lysis Buffer，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 Buffer RL 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:Buffer RL = 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 Buffer RL 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($\leq 1 \times 10^6$)：加入适量的 Buffer RL 至细胞样品中，打散细胞。

离心收集的细胞：先弹打或涡旋使细胞松散，然后加入适量的 Buffer RL，涡旋或吸打打散细胞。

- $\leq 1 \times 10^6$ 细胞：加入 350 μ l Buffer RL，用一次性的注射器抽打裂解液 3~5 次；
- $\leq 1 \times 10^5$ 细胞：加入 150 μ l Buffer RL，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 Buffer RL。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。

- 6 cm 直径的培养皿：加入 350 μ l Buffer RL，用一次性的注射器抽打裂解液 5 次；
- 处理 $\leq 1 \times 10^5$ 细胞的多孔板：加入 Buffer RL，用移液枪吸打 3-5 次；

- B. **动物组织**: 把不超过 10mg 动物软组织(内脏)样品放置于离心管中, 加入 350 μ l Buffer RL, 选择合适的匀浆工具进行匀浆, 14,000 \times g 离心 3 分钟得上清液备用。

处理肌肉、皮肤或心脏等肌纤维含量高的样品: 取 300 μ l 组织匀浆液, 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。14,000 \times g 离心 3 分钟得上清液备用。

- C. **植物或真菌 (<50mg)**: 转移不超过 50mg 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, 立即加入 350 μ l Buffer RL, 涡旋混匀 5-10 秒。室温下, 14,000 \times g 离心 3 分钟得上清液备用。

过柱去除 DNA

1. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把细胞裂解液或组织匀浆液上清转移至 gDNA 过滤柱中, 12,000 \times g 离心 2 分钟。
2. 丢弃 gDNA 过滤柱, 加入等倍体积 70%乙醇至滤液中, 用移液枪吸打 3~5 次。

过柱纯化 RNA

3. 把 HiPure RNA Micro Column 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
4. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer RW1 至柱子上。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
5. 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。
6. 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。
7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心 2 分钟。
8. 将柱子转移至 1.5ml 离心管, 加入 10-50 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 10 μ l, 若 RNA 产量超过 10 μ g, 推荐进行第二次洗脱。本产品只回收 >200nt RNA, 低于 200nt 的 RNA(约占 15-20%), 包括 5S RNA 和 tRNA 等, 在纯化过程中被去掉。

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。