

## 目 录

|                       |   |
|-----------------------|---|
| 简 介                   | 2 |
| 原 理                   | 2 |
| 保质期                   | 2 |
| 试剂盒组成                 | 3 |
| 准备工作                  | 3 |
| 方案 1:组织/细胞总 RNA 抽提    | 4 |
| 方案 2: 组织/细胞小分子 RNA 富集 | 6 |
| 常见问题回答                | 8 |

版本: 202401

## 简介

HiPure Tissue/Cell miRNA Kit 是从细胞和组织中提取 RNA、小分子 RNA 最为快速和简单的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，抽提过程中无需用到危险的酚氯仿抽提，也无需用到耗时的醇类沉淀。试剂盒适合从小于  $1 \times 10^7$  培养细胞提取得总 RNA 或小分子 RNA。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern Blot、核酸保护和体外翻译等实验。

## 原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理因素吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

样品在 Buffer RL 裂解液匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。由于裂解液中含异硫氰酸胍和苯酚，内源性或外源性的 RNASE 变性而失活，RNA 被保护起来。加入乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，大分子 RNA(>200nt)被吸附上柱子的膜上，而小分子 RNA(<200nt)不被吸附。收集含小分子 RNA 的滤液，加入更多的乙醇调节小分子 RNA 的结合能力，并转移至吸附柱吸附小分子 RNA。吸附了大分子或小分子的柱子经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后被 RNASE-Free Water 洗脱。

## 保质期

HiPure Tissue/Cell miRNA Kit 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。Proteinase K 干粉可以在室温下保存一年，但溶解后必须保存于-20~8℃。

## 组 成

### HiPure Tissue/Cell miRNA Kit

| 产品编号                     | R4311-01 | R4311-02 | R4311-03  |
|--------------------------|----------|----------|-----------|
| 纯化次数                     | 10 次     | 50 次     | 250 次     |
| gDNA Filter Mini Columns | 10       | 50       | 250       |
| HiPure RNA Mini Columns  | 10       | 50       | 250       |
| 2ml Collection Tubes     | 20       | 100      | 500       |
| Buffer RL                | 10 ml    | 30 ml    | 150 ml    |
| Proteinase K             | 6 mg     | 24 mg    | 120 mg    |
| Protease Dissolve Buffer | 1.8 ml   | 1.8 ml   | 15 ml     |
| Buffer RWC*              | 5 ml     | 20 ml    | 80 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         |

### 需要准备材料和工具

- 用无水乙醇稀释 Buffer RWC，并于室温保存。
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml，轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在 2~8℃ 保存一年，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于 8~-20℃。
- (可选)提升裂解液的变性能力: 使用前分装适量的 Buffer RLC，按每 ml Buffer RLC 加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP，该混合液室温可保存 1 周。

## 方案 1. 总 RNA (含小分子 RNA) 的提取

1. 根据样品类型，加入适量的 Buffer RL 裂解和匀浆细胞或组织样品中。

**离心收集的细胞：**弹打或涡旋松散细胞，加入 400 $\mu$ l Buffer RL，涡旋或吸打重悬细胞，用移液枪吸打 5-10 次匀浆细胞。

**贴壁细胞：**彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 450~500 $\mu$ l Buffer RL，用细胞刮刮下细胞，并转移 400 $\mu$ l 裂解液至离心管中。

**动物组织：**取 5~20mg 动物组织样品，加入 450~500 $\mu$ l Buffer RL 进行充分匀浆，并转移 400 $\mu$ l 匀浆液至离心管中。

2. 加入 200 $\mu$ l RNase Free Water 和 20 $\mu$ l Proteinase K 至匀浆液中，涡旋混匀 10 秒。55 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。
3. 13,000  $\times$  g 离心 5 分钟去除未消化的颗粒。  
处理细胞或消化液澄清时，可以省略离心步骤。
4. 把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。转移消化液至 gDNA 柱子中。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟，弃去 gDNA 过滤柱。
5. 加入 900 $\mu$ l 无水乙醇至滤液中，用移液器吸打混匀 3-5 次。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq$ 750 $\mu$ l 混合液至 RNA 柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。把剩余混合液转移至 RNA 柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RWC(乙醇稀释) 至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(乙醇稀释) 至柱子中。

12,000 × g 离心 30-60 秒。

Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。

10. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。加入 500µl Buffer RW2(乙醇稀释)至柱子中。

12,000 × g 离心 30-60 秒。

11. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。12,000 × g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。

12. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~50µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。

HiPure RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 15µl，小于 15µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若细胞量  $3 \times 10^6$ ，推荐用 30~50µl RNase Free Water 至柱子中进行洗脱。若细胞量小于  $1 \times 10^6$ ，推荐用 15~30µl RNase Free Water 至柱子中洗脱一次。

13. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于 -80°C。

## 方案 2. miRNA 富集提取(除大片段 RNA)

1. 加入 400~500 $\mu$ l Buffer RL 至样品中，重悬打散样品。用移液枪吸打 5~10 次匀浆。根据样品类型，加入适量的 Buffer RL 裂解和匀浆细胞或组织样品中。

**离心收集的细胞：**弹打或涡旋松散细胞，加入 400 $\mu$ l Buffer RL，涡旋或吸打重悬细胞，用移液枪吸打 5-10 次匀浆细胞。

**贴壁细胞：**彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 450~500 $\mu$ l Buffer RL，用细胞刮刮下细胞，并转移 400 $\mu$ l 裂解液至离心管中。

**动物组织：**取 5~20mg 动物组织样品，加入 450~500 $\mu$ l Buffer RL 进行充分匀浆，并转移 400 $\mu$ l 匀浆液至离心管中。

2. 加入 200 $\mu$ l RNase Free Water 和 20 $\mu$ l Proteinase K 至匀浆液中，涡旋混匀 10 秒。55 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。
3. 加入 300 $\mu$ l 无水乙醇至裂解液中，涡旋混匀 5-10 秒。12,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
4. 把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。转移第 3 步的全部上清液至 gDNA 过滤柱中。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟，弃去 gDNA 过滤柱。
5. 加入 600 $\mu$ l 无水乙醇至滤液中，用移液器吸打混匀 3-5 次。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在新的 2ml 收集管中。转移 $\leq$ 750 $\mu$ l 混合液至 RNA 柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。把剩余混合液转移至 RNA 柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RWC(乙醇稀释) 至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(乙醇稀释) 至柱子中。

12,000 × g 离心 30-60 秒。

Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。

10. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。加入 500µl Buffer RW2(乙醇稀释)至柱子中。  
12,000 × g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。12,000 × g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
12. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~50µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。

HiPure RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 15µl，小于 15µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若细胞量  $3 \times 10^6$ ，推荐用 30~50µl RNase Free Water 至柱子中进行洗脱。若细胞量小于  $1 \times 10^6$ ，推荐用 15~30µl RNase Free Water 至柱子中洗脱一次。

13. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于 -80°C。

## 常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 技术人员可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学上碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

| 现象                      | 原因及解决方法   |
|-------------------------|---|
| <b>柱子堵塞</b>             |   |
| 样品匀浆不充分                 | 用一次性 1ml 注射器抽打几次进一步匀浆   |
| 样品起始用量太多                | 减少样品用量。过多的细胞量会造成产量和纯度的下降。   |
| 低温离心                    | 试剂盒中除特别指明，所有的离心操作都必须在室温（20-25℃）。  |
| <b>RNA 产量低</b>          |   |
| 样品匀浆不充分                 | 参照上面  |
| 样品起始用量太多                | 参照上面  |
| RNA 的洗脱效率低              | DEPC 水需直接加到膜上，建议进行第二次洗脱   |
| 培养液没彻底去除                | 从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。   |
| Buffer RW2/RWC 没有加入乙醇稀释 | Buffer RW2/RWC 使用前，必须加入无水乙醇进行稀释   |
| <b>RNA 降解</b>           |   |
| 样品用量太多                  | 减少样品用量，正确样品用量是获得理想结果的先决条件   |
| RNA 酶污染                 | 操作过程引入 RNA 酶的污染或溶液污染  |
| $\beta$ -巯基乙醇或 DTT      | 使用前，分装适量的 Buffer RL，每 1ml Buffer RL 加入 20 $\mu$ l $\beta$ -巯基乙醇或 1M DTT，以提高裂解液的抑制能力。            |
| <b>下游实验结果不理想</b>        |   |
| 盐类污染                    | 加入 Buffer RW2 后，静置 3 分钟再离心。   |
| 乙醇污染                    | 确保空柱离心时速度 12,000 x g，离心时间为 2 分钟。  |
| A260/230 太高             | 由于异硫氰酸胍在 A230 中有较高的本底吸收峰。当核酸浓度低于 50ng/ $\mu$ l 时，较高的本底 A230 吸收峰，A260/230 有可能小于 1.0，但不会影响抑制下游应用。 |