

HiPure Universal DNA, RNA, miRNA Kit

通用型 RNA/DNA 共提试剂盒

产品简介

本产品适合于从 $\leq 1 \times 10^7$ 个培养细胞、 $\leq 30\text{mg}$ 动物组织、 $\leq 100\text{mg}$ 常规的植物/真菌组织样品中同时提取得到DNA和总RNA(miRNA)和DNA。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50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。得到的DNA可直接用于PCR，Southern杂交等。

产品组份

| 产品编号 | R5114-01 | R5114-02 | R5114-03 |
|----------------------------|----------|-----------|-----------|
| 纯化次数 | 10次 | 50次 | 250次 |
| HiPure RNA Mini Columns | 10 | 50 | 250 |
| HiPure DNA Mini Columns II | 10 | 50 | 250 |
| 2ml Collection Tubes | 20 | 100 | 500 |
| Buffer RLC | 10 ml | 30 ml | 200 ml |
| Proteinase K Solution | 0.3 ml | 1.2 ml | 6.0 ml |
| Buffer GWP | 10 ml | 30 ml | 150 ml |
| Buffer RVV* | 5 ml | 20 ml | 80 ml |
| Buffer RW2* | 5 ml | 2 x 20 ml | 3 x 50 ml |
| RNase Free Water | 5 ml | 30 ml | 120 ml |
| Elution Buffer | 1.5 ml | 10 ml | 30 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，长期保存时需置于 2~8℃。低温下，Buffer RLC 可能会有沉淀形成，55℃水浴让沉淀完全溶解。

实验步骤

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 在 Buffer RWC 中，加入 2 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 Buffer RLC，按每 1ml Buffer RLC 加入 20μl 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。

A. 培养细胞(<5 × 10⁶)

1. 加入 400~500μl Buffer RLC 至细胞样品中，打散细胞。

悬浮细胞：离心收集细胞，弹打松散沉淀，加入 400μl Buffer RLC，涡旋或用移液枪敲打打散细胞。

贴壁细胞：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 450~500μl Buffer RLC，用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，转移 400μl 裂解液至 1.5ml 离心管中。

2. 加入 200μl RNase Free Water 和 20μl Proteinase K Solution (20mg/ml)至裂解液，涡旋混匀 10 秒。55℃振荡温育 15 分钟，按第 3 步进行操作。

B. 固体组织（动物组织<20mg，植物样品<100mg）

1. 称取组织样品，选择合适的工具进行匀浆，加入适量的 Buffer RLC。

- **[液氮研磨]** 用液氮把组织块磨成粉末，转移样品至离心管中。加入 400 μl Buffer RLC，剧烈涡旋混匀。若组织粉末沾在研钵上无法转移，把~500μl Buffer RLC 加到研钵中，研磨使裂解液与组织尽快混合，解冻后转移 400μl 裂解液至离心管中，按第 2 步进行操作。

- **[机械研磨]** 把组织块放置于匀浆管中，加入~500 μ l Buffer RLC，用机械匀浆器匀浆或一次性研磨杵进行匀浆，转移 400 μ l 裂解液至离心管中，按第 2 步进行操作。
2. 加入 200 μ l RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K Solution (20mg/ml)至裂解液。涡旋混匀 10 秒。55 $^{\circ}$ C 振荡温育 15 分钟，14,000 \times g 离心 3 分钟。按第 3 步进行操作。

过柱纯化 DNA

3. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。转移 600 μ l 裂解液至 DNA 柱子中。14,000 \times g 离心 2 分钟。保存收集管的滤液，按第 10~19 步进行总 RNA 抽提。
4. 把 DNA 柱子装回新的收集管。加入 500 μ l Buffer GWP 至柱子上。静置 2 分钟，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(已用乙醇稀释)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(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃流出液，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 离心管中，加入 50-100 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子膜中央。放置 5 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 再加入 50-100 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子膜中央。放置 5 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

过柱纯化 RNA

10. 收集第 3 步的滤液，加入 300 μ l 或 900 μ l 无水乙醇至滤液中，吸打混匀 3-5 次。
提取总 RNA 时，加入 300 μ l 乙醇；若需提取 miRNA(<200nt)，加入 900 μ l 乙醇。
11. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移不超过 750 μ l 混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子上。12,000 \times g 离心 30~60 秒。

14. 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)至柱子中，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
15. 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)至柱子中，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
16. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心 2 分钟。
17. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30-100 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。
当 RNA 总量高于 10 μ g 时，OD_{260/230} 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 μ g 时，A_{260/230} 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3 μ g，A_{260/230} 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 A_{260/230} 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 μ g）时，OD_{260/230} 可以明显改善。