

HiPure Universal Nucleic Acid Kit

通用型 RNA 和 DNA 提取试剂盒

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总核酸，包括DNA和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50分钟。

产品组份

产品编号	R5217-01	R5217-02	R5217-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer RTL	10 ml	30 ml	150 ml
RNA Digestion Buffer	3 ml	15 ml	60 ml
Proteinase K Solution	0.3 ml	1.2 ml	6.0 ml
Buffer GW1	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	5 ml	15 ml	60 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。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 在 Buffer GW1 中，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 20μl β-巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP (货号 C175)，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。

实验步骤

A. 细胞类样品：

初次使用时，建议使用 2×10^6 个细胞。根据结果再调整细胞量。但不论何种情况，细胞量不要超过 5×10^6 。

1. 加入 RTL Lysis Buffer 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，加入 500μl RTL Lysis Buffer，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

直接裂解：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 500μl RTL Lysis Buffer。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，转移至 1.5ml 离心管中。

全血样品：取 1ml 新鲜血液样品，用淋巴细胞分离液分离得到白细胞沉淀，弹打松散白细胞沉淀，加入 500μl RTL Lysis Buffer，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

2. 用注射器或移液枪抽打裂解液 3~5 次匀浆样品降低裂解液的粘稠度。

3. 加入 200μl RNA Digestion Buffer 和 20μl Proteinase K，颠倒混匀 6-8 次，室温放置 15

分钟。按第 4 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 RTL。
 - **[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 500 μ l Buffer RTL，剧烈涡旋混匀。若组织粉末沾在研钵上无法转移，把~600 μ l Buffer RTL 加到研钵中，研磨使裂解液与组织尽快混合，解冻后转移 500 μ l 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 RTL，用机械匀浆器匀浆或一次性研磨杵进行匀浆，转移 500 μ l 裂解液至离心管中。
2. 加入 200 μ l RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K (20mg/ml)至裂解液。涡旋混匀 10 秒。55 $^{\circ}$ C 振荡温育 15 分钟。
3. 14,000 \times g 离心 3 分钟，转移上清液至新的离心管中，按第 4 步进行操作。

过柱纯化

4. 加入 0.5 倍体积或 1.5 倍体积的无水乙醇至样品中，涡旋混匀 10-15 秒。
若需获取 miRNA，加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清液中。
5. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 \leq 750 μ l 混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. (可选:混合液超过 750 μ l) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer GW1 至柱子上。12,000 \times g 离心 2 分钟，丢去滤液和柱子。
8. 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。

9. 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。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心 2 分钟。
11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 再加入 30~50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 弃去柱子，把 RNA/DNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 20 μ l，若 RNA 产量超过 30 μ g，推荐进行第二次洗脱。本产品只回收>200nt 的 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA 和 rRNA 等，在纯化过程中被去掉，可起到富集 mRNA 的作用。

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 1.0~2.0；当 RNA 总量低于 3 μ g，A260/230 会低于 1。这是因为 Buffer RTL 和 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 主要受试剂中胍盐影响，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，OD260/230 可以明显改善。