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≤1 x 10^7个培养细胞、≤30mg动物组织 、≤100mg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	0.3 ml	1.2 ml	6.0 ml
Buffer GWP	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RWC*	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。

A. 培养细胞(<5 x 10^6)

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，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。
   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 (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~500μl Buffer RLC，用机械匀浆器匀浆或一次性研磨杵进行匀浆，转移 400μl 裂解液至离心管中，按第 2 步进行操作。

2. **加入 200μl RNase Free Water 和 20μl Proteinase K (20mg/ml)至裂解液。**涡旋混匀 10 秒。55℃振荡温育 15 分钟，14,000 x 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 600μl 裂解液至 DNA 柱子中。**14,000 × 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 500μl Buffer GWP 至柱子上。静置 2 分钟，**12,000 x g 离心 30~60 秒。

5. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**12,000 × g 离心 30~60 秒。

6. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**12,000 × g 离心 30~60 秒。

7. **倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 x g 离心 2 分钟。**

8. **将柱子转移至 1.5ml 离心管中，加入 50-100μl 预热至 55℃Elution Buffer 至柱子膜中央。放置 5 分钟。**12,000 × g 离心 1 分钟。

9. **再加入 50-100μl 预热至 55℃Elution Buffer 至柱子膜中央。放置 5 分钟。**12,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 DNA 保存于-20℃。

过柱纯化 RNA

10. **收集第 3 步的滤液，加入 300μl 或 900μl 无水乙醇至滤液中，吸打混匀 3-5 次。**
提取总 RNA 时，加入 300μl 乙醇；若需提取 miRNA(<200nt)，加入 900μl 乙醇。

11. **把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移不超过 750μl 混合液至柱子中。**12,000 x 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 x g 离心 30~60 秒。

13. **倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500μl Buffer RWC 至柱子上。**12,000 x g 离心 30~60 秒。

14. **倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**12,000 × g 离心 30~60 秒。

15. **倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**12,000 × g 离心 30~60 秒。

16. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 x g 离心 2 分钟。

17. **将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30-100μl RNase Free Water 至柱子膜中央。**室温静置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80℃。

    当 RNA 总量高于 10μg 时, OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10μg 时，A260/230 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3μg，A260/230 会低于 0.6。这是因为 Buffer RLC、RWC 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。研发表明，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>10ug)时，OD260/230 可以明显改善。