

## HiPure Total RNA Mini Kit

总 RNA 小量抽提试剂盒(双柱型)

本产品适合于从 $\leq 1 \times 10^7$  个培养细胞、 $\leq 30\text{mg}$  动物软组织(肝脏、脾脏、肾脏, 脑等)、 $\leq 200\text{mg}$  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	R4111-01	R4111-02	R4111-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	10 ml	50 ml	250 ml
Reagent DX	-	0.5 ml	1.5 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 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

版本号: 2018-01

### 保 存 条 件

本产品可在室温(15~25°C)保存 18 个月, 长期保存时需置于 2~8°C。低温下, Buffer RL 可能会有沉淀形成, 55°C 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。
- 70%乙醇(DEPC 处理水配制)
- (可选)Reagent DX(消泡剂): 每 1ml Buffer RL 加入 5 $\mu$ l Reagent DX, Reagent DX 能高效消除匀浆过程产生的泡沫。

## 实验步骤

### A. 培养细胞的收集和裂解

本产品单次可处理  $10^2\sim 10^7$  个细胞。初次使用时，建议使用  $2\sim 5 \times 10^6$  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  $1 \times 10^7$ 。

#### 1. 加入适量的 Buffer RL 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，根据细胞量加入适量的 Buffer RL，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

- $\leq 5 \times 10^6$  细胞：加入 400 $\mu$ l Buffer RL;
- $\geq 5 \times 10^6$  细胞：加入 750 $\mu$ l Buffer RL;

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

- 6 cm 直径的培养皿：加入 400 $\mu$ l Buffer RL;
- 6-10cm 直径的培养皿：加入 750 $\mu$ l Buffer RL;

#### 2. 用注射器或移液枪抽打裂解液 5~10 次打断 DNA，按第 3 步进行操作。

### B. 组织样品的裂解

本产品可处理 <30mg 动物组织、50~200mg 植物组织。正确组织量是获得理想产量和纯度的关键。肝脏 10~20mg，脾脏/胸胰小于 10mg，植物 50~200mg。初次使用时，推荐动物组织量为 10~15mg，植物为 50~100mg。根据结果再调整用量。处理肌纤维样品(肌肉/皮肤/心脏)，需另外订购 Proteinase K(20mg/ml)。处理富含脂类组织推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器等工具进行匀浆。处理复杂样品，建议使用 HiPure HP Plant RNA Mini Kit (R4165)。

#### 1. 取组织样品，加入 Buffer RL，用合适工具进行匀浆，室温静置 3~5 分钟。

- $\leq 10$ mg 动物组织：加入 500 $\mu$ l Buffer RL 进行匀浆；
- $> 10$ mg 动物组织：加入 750 $\mu$ l Buffer RL 进行匀浆；
- $\leq 30$ mg 难裂解组织(肌肉/皮肤): 用 500~700 $\mu$ l Buffer RL 匀浆肌肉类组织样

本。取 500 $\mu$ l 匀浆液, 加入 250 $\mu$ l RNase Free Water 和 20 $\mu$ l Proteinase K(需另外订购), 颠倒混匀, 55 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。

- $\leq$ 200mg 植物样品: 用液氮将植物或真菌研磨成粉末。取 50~200mg 粉末至 1.5~2.0ml 预冷的离心管中, 立即加入 800 $\mu$ l Buffer RL, 涡旋 15 秒打散样品, 室温静置 3 分钟。[初次使用推荐样品量为 50~100mg, 根据结果再调整用量。易提取样品, 样品量可达到 300mg.]

2. 14,000  $\times$  g 离心 5 分钟。按第 3 步进行操作。

### 过柱去除 DNA

3. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。把细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中。14,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
4. 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。处理肝脏和脾脏时, 用 50%乙醇代替 70%乙醇可以提高产量。更方便时, 可以用 Buffer RW2 代替 70%乙醇。

### 过柱纯化 RNA

5. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq$ 750 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子上。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。  
若需彻底去除 DNA 污染, 建议用 DNase on Column Kit(R4911)进行膜上 DNase 消化。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ 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 $\mu$ 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 20-100 $\mu$ 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。

## 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 去除效果取决于样品类型和用量。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。