

## HiPure Total RNA Plus Kit (phenol-Free)

### 总 RNA 小提带酶试剂盒

本产品适合于从 $\leq 5 \times 10^6$ 个培养细胞、 $\leq 20\text{mg}$ 动物组织样品中提取总 RNA(含 miRNA)。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。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	R4121-01B	R4121-02B	R4121-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
gDNA Filter Mini Column	10	50	250
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	30	150	6 x 100
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	2 ml	2 ml	15 ml
DNase I	120 $\mu\text{l}$	600 $\mu\text{l}$	5 x 600 $\mu\text{l}$
DNase Buffer	1 ml	6 ml	30 ml
RTL Lysis Buffer	10 ml	30 ml	120 ml
RNA Digestion Buffer	5 ml	15 ml	60 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

版本号：2018-01

### 保存条件

本产品除 DNase I 外，其它组分可以室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$ )保存 18 个月，长期保存时需置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。DNase I 采用 2~8 度运输，收到产品后，把 DNase 保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 或 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。低温下，RTL Lysis Buffer 可能会有沉淀形成，55 $^{\circ}\text{C}$ 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。
- 在 Buffer RWC 中，按标签所示加入适量的无水乙醇，于室温保存。

## 实验步骤

### A. 细胞类样品:

初次使用时，建议使用  $2 \times 10^6$  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  $5 \times 10^6$ 。

#### 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 400 $\mu$ l 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 400 $\mu$ l 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 400 $\mu$ l 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 次打断 DNA。

#### 3. 加入 200 $\mu$ l RNA Digestion Buffer 和 20 $\mu$ l Proteinase K，涡旋混匀 15 秒。室温放置 15 分钟。按第 4 步进行操作。

### B. 组织样品的裂解:

本产品单次可处理  $\leq 20$ mg 动物组织。初次使用时，推荐起始动物组织量为 10mg。根据结果再调整用量。样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器、珠磨仪等工具进行匀浆。

#### 1. 称取小于 20mg 组织样品，选择合适的工具进行匀浆，加入 400 $\mu$ l RTL Lysis Buffer。

#### 2. 加入 200 $\mu$ l RNA Digestion Buffer 和 20 $\mu$ l Proteinase K，涡旋混匀，55 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。

#### 3. 室温下，14,000 $\times$ g 离心 5 分钟。按第 4 步进行操作。

### 过柱纯化 RNA(含 miRNA)

#### 4. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。把裂解液或上清液转移至 gDNA 过滤柱中。14,000 $\times$ g 离心 2 分钟。

若需 DNA，取 DNA 过滤柱，用 400 $\mu$ l Buffer RWC 洗涤一次，用 500 $\mu$ l Buffer RW2 洗涤两次，空甩后用 50~100 $\mu$ l Buffer TE 或灭菌水洗脱 DNA。

5. **加入 0.5 倍或 1.5 倍体积无水乙醇至滤液中**，用移液枪吸打 5~8 次。  
提取 mRNA 时，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，能有效去除小于 200nt 的 5SRNA 和 tRNA，提高 RNA 的纯度；若需 miRNA，加入 1.5 倍体积的无水乙醇，
6. **把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 ≤750μl 混合液至柱子中。**  
12,000 × g 离心 30~60 秒。
7. **(可选:混合液超过 750μl) 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 × g 离心 30~60 秒。
8. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 300μl Buffer RWC 至柱子上。** 12,000 × g 离心 60 秒。
9. **把 RNA 柱装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液并混匀。把 DNase I 反应液加到 RNA 柱的膜中央，室温(15-30°C)静置 15 分钟。**

成分	用量
DNase Buffer	60 μl
DNase I (20Units/μl)	10 μl

10. **加入 500μl Buffer RWC 至柱子上，静置 10 分钟。** 12,000 × g 离心 30~60 秒。
11. (可选)若需获得 miRNA，把滤液再转移至柱子中，并把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 30~60 秒。
12. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW2 至柱子中，** 12,000 × g 离心 30~60 秒。  
Buffer RW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
13. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW2 至柱子中，** 12,000 × g 离心 30~60 秒。
14. **倒弃流出液，把柱子装回收集管。** 12,000 × g 离心 2 分钟。
15. **将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 20~80μl 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°C。  
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 20μl，若 RNA 产量超过 30μg，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 tRNA 等，在纯化过程中被去掉，可起到富集 mRNA 的作用。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多**：减少样品量，超量的组织或细胞反而会降低产量和纯度。
- **样品富含肌纤维**：肌肉、心脏、皮肤以及一些低等小型生物含肌纤维，肌纤维分子量太大会引起柱子堵塞。建议用 HiPure Fibrous RNA Kit。或订购 Proteinase K，按难裂解组织进行抽提。
- **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。
- **提升 RTL Lysis Buffer 的变性 RNASE 的能力**：使用前分装适量的 RTL Lysis Buffer，按每 ml RTL Lysis Buffer 加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇或 2M DTT，混合液室温可保存 1 周。由于  $\beta$ -巯基乙醇/DTT 的毒性，多数情况下，不添加也可以得到完整的 RNA。
- **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 RTL Lysis Buffer 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。

### 3. DNA 的污染

- **DNase I 消化**：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。