

目 录

| | |
|-----------------------|---|
| 简 介 | 2 |
| 原 理 | 2 |
| 保质期 | 2 |
| 试剂盒组成 | 3 |
| 准备工作 | 3 |
| 方案 1:组织/细胞总 RNA 抽提 | 4 |
| 方案 2: 组织/细胞小分子 RNA 富集 | 6 |
| 常见问题回答 | 8 |

版本: 2018-03

简介

HiPure Tissue/Cell miRNA Kit 是从细胞和组织中提取 RNA、小分子 RNA 最为快速和简单的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，抽提过程中无需用到危险的酚氯仿抽提，也无需用到耗时的醇类沉淀。试剂盒适合从小于 1×10^7 培养细胞提取得总 RNA 或小分子 RNA。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern Blot、核酸保护和体外翻译等实验。

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理因素吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

样品在 Buffer RL 裂解液匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。由于裂解液中含异硫氰酸胍和苯酚，内源性或外源性的 RNASE 变性而失活，RNA 被保护起来。加入乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，大分子 RNA(>200nt)被吸附上柱子的膜上，而小分子 RNA(<200nt)不被吸附。收集含小分子 RNA 的滤液，加入更多的乙醇调节小分子 RNA 的结合能力，并转移至吸附柱吸附小分子 RNA。吸附了大分子或小分子的柱子经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后被 RNASE-Free Water 洗脱。

保质期

HiPure Tissue/Cell miRNA Kit 可在室温下(15-25°C)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8°C。Proteinase K 干粉可以在室温下保存一年，但溶解后必须保存于 8~ -20°C。

组成

HiPure Tissue/Cell miRNA Kit

| 产品编号 | R4311-01 | R4311-02 | R4311-03 |
|----------------------------|----------|----------|-----------|
| 纯化次数 | 10 次 | 50 次 | 250 次 |
| HiPure gDNA Filter Columns | 10 | 50 | 250 |
| HiPure RNA Mini Columns | 10 | 50 | 250 |
| 2ml Collection Tubes | 20 | 100 | 500 |
| Buffer RL | 10 ml | 30 ml | 150 ml |
| Reagent DX | - | 500 ul | 1.5 ml |
| Proteinase K | 6 mg | 24 mg | 120 mg |
| Protease Dissolve Buffer | 1.8 ml | 1.8 ml | 15 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 |
| 说明书 | 1 | 1 | 1 |

*. Buffer RWC 和 Buffer RW2 使用前需加入无水乙醇进行稀释。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 用无水乙醇稀释 Buffer RWC，并于室温保存。
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml，轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在 2~8℃ 保存一年，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于 8~ -20℃。

方案 1. 细胞/组织总 RNA(含小分子 RNA)的提取

该方案适合于从 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞中提取总 RNA(含小分子 RNA)。以下离心都在室温下进行。

1. 加入 400~500 μ l Buffer RL 和 2 μ l Reagent DX 至样品中，重悬打散样品。用移液枪吸打 5~10 次匀浆样品。

离心收集的细胞：弹打或涡旋松散细胞，加入 400 μ l Buffer RL 和 2 μ l Reagent DX，涡旋或吸打重悬细胞，用移液枪吸打 5-10 次。

贴壁细胞：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 450~500 μ l Buffer RL 和 2 μ l Reagent DX。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，并转移 400 μ l 匀浆液至离心管中。

动物组织：取 1~20mg 动物组织样品，加入 450~500 μ l Buffer RL 和 2 μ l Reagent DX 进行充分匀浆，并转移 400 μ l 匀浆液至离心管中。

植物组织：取 50~100mg 植物组织样品，加入 450~500 μ l Buffer RL 进行充分匀浆，并转移 400 μ l 匀浆液至离心管中。

2. 加入 200 μ l RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K 至匀浆液中，涡旋混匀。室温放置 15~20 分钟。
3. (可选) 13,000 \times g 离心 5 分钟去除未消化的颗粒。处理细胞时，不需要离心。

去除基因组 DNA

4. 把 HiPure gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。转移第 2/3 步的裂解液至 gDNA 柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。弃去 HiPure gDNA Filter Column。

纯化总 RNA (含小分子 RNA)

5. 加入 900 μ l 无水乙醇至滤液中，颠倒混匀数次。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在另一个新的 2ml 收集管中。转移 $\leq 750\mu$ l 混合液至 RNA 柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。

7. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。**把剩余混合液转移至 RNA 柱子中。**10,000 × g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。**加入 500µl Buffer RWC(乙醇稀释) 至柱子中。**10,000 × g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(乙醇稀释) 至柱子中。**10,000 × g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。
10. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(乙醇稀释)至柱子中，**10,000 × g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。10,000×g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
12. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~50µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 1 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
HiPure RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 15µl，小于 15µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若细胞量 3×10^6 ，推荐用 30~50µl RNase Free Water 至柱子中进行洗脱。若细胞量小于 1×10^6 ，推荐用 15~30µl RNase Free Water 至柱子中洗脱一次。
13. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80°C。

方案 2. 细胞小分子 RNA 富集提取

该方案适合从 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞中富集小分子 RNA，以下离心都在室温下进行。

细胞的裂解和匀浆

1. 加入 400~500 μ l Buffer RL 和 2 μ l Reagent DX 至样品中，重悬打散样品。用移液枪吸打 5~10 次匀浆样品。

离心收集的细胞：弹打或涡旋松散细胞，加入 400 μ l Buffer RL 和 2 μ l Reagent DX，涡旋或吸打重悬细胞，用移液枪吸打 5-10 次。

贴壁细胞：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 450~500 μ l Buffer RL 和 2 μ l Reagent DX。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，并转移 400 μ l 匀浆液至离心管中。

动物组织：取 1~20mg 动物组织样品，加入 450~500 μ l Buffer RL 和 2 μ l Reagent DX 进行充分匀浆，并转移 400 μ l 匀浆液至离心管中。

植物组织：取 50~100mg 植物组织样品，加入 450~500 μ l Buffer RL 进行充分匀浆，并转移 400 μ l 匀浆液至离心管中。

2. 加入 200 μ l RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K 至匀浆液中，涡旋混匀。55 $^{\circ}$ C 放置 15 分钟。
3. （可选）13,000 \times g 离心 5 分钟去除未消化的颗粒。处理细胞时，不需要离心。

去除基因组 DNA 和大分子 RNA

4. 加入 200 μ l 无水乙醇至裂解液中，用移液枪吸打 3~5 次。
5. 把 HiPure gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。转移第 4 步的混合液($\leq 700\mu$ l) 至 HiPure gDNA Filter Column 柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。

富集小分子 RNA

6. 再加入 700 μ l 无水乙醇至滤液中，颠倒混匀。
7. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq 750\mu$ l 混合液至 RNA 柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。

8. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**继续把混合液转移至 RNA 柱子中。**10,000 × g 离心 30~60 秒。重复此步直至所有混合液转移至柱子中并离心。
9. 倒弃流出液，把 RNA 柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RWC(乙醇稀释) 至柱子中。**10,000 × g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃流出液，把 RNA 柱子装回收集管中。**加入 500 µl Buffer RW2(乙醇稀释) 至柱子中。**10,000 × g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书进行稀释。
11. 倒弃流出液，把 RNA 柱子装回收集管中。**加入 500 µl Buffer RW2(乙醇稀释)至柱子中，**10,000 × g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃流出液，把 RNA 柱子装回收集管中。10,000 × g 离心空柱 2 分钟。
13. 把柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~50 µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
14. 弃去 RNA 柱子，把 miRNA 保存于-80°C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 技术人员可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学上碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

| 现象 | 原因及解决方法 |
|-------------------------|---|
| 柱子堵塞 | |
| 样品匀浆不充分 | 用一次性 1ml 注射器抽打几次进一步匀浆 |
| 样品起始用量太多 | 减少样品用量。过多的细胞量会造成产量和纯度的下降。 |
| 低温离心 | 试剂盒中除特别指明，所有的离心操作都必须在室温（20-25℃）。 |
| RNA 产量低 | |
| 样品匀浆不充分 | 参照上面 |
| 样品起始用量太多 | 参照上面 |
| RNA 的洗脱效率低 | DEPC 水需直接加到膜上，建议进行第二次洗脱 |
| 培养液没彻底去除 | 从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。 |
| Buffer RW2/RWC 没有加入乙醇稀释 | Buffer RW2/RWC 使用前，必须加入无水乙醇进行稀释 |
| RNA 降解 | |
| 样品用量太多 | 减少样品用量，正确样品用量是获得理想结果的先决条件 |
| RNA 酶污染 | 操作过程引入 RNA 酶的污染或溶液污染 |
| β -巯基乙醇或 DTT | 使用前，分装适量的 Buffer RL，每 1ml Buffer RL 加入 20 μ l β -巯基乙醇或 1M DTT，以提高裂解液的抑制能力。 |
| 下游实验结果不理想 | |
| 盐类污染 | 加入 Buffer RW2 后，静置 3 分钟再离心。 |
| 乙醇污染 | 确保空柱离心时速度 12,000 x g，离心时间为 2 分钟。 |
| A260/230 太高 | 由于异硫氰酸胍在 A230 中有较高的本底吸收峰。当核酸浓度低于 50ng/ μ l 时，较高的本底 A230 吸收峰，A260/230 有可能小于 1.0，但不会影响抑制下游应用。 |