

RaPure Total RNA Mini Kit

总 RNA 快提试剂盒(单柱型)

本产品适合于从 $\leq 5 \times 10^6$ 个培养细胞、 $\leq 20\text{mg}$ 动物软组织(肝脏、脾脏、肾脏, 脑等)、 $\leq 100\text{mg}$ 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。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 | R4011-01 | R4011-02 | R4011-03 |
|-------------------------|----------|----------|-----------|
| 纯化次数 | 10 次 | 50 次 | 250 次 |
| HiPure RNA Mini Columns | 10 | 50 | 250 |
| 2ml Collection Tubes | 10 | 50 | 250 |
| RTL Lysis Buffer | 10 ml | 50 ml | 220 ml |
| RNA Binding Buffer* | 3 ml | 15 ml | 75 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 |

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, RTL Lysis Buffer 可能会有沉淀形成, 55°C 水浴让沉淀完全溶解。因 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, 推荐分装保存于 2~8°C, 以减少污染。

准备事项

- 在 Buffer RV2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 在 RNA Binding Buffer 中，按标签所示加入适量的无水乙醇，于室温保存。
- (可选)提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 RTL Lysis Buffer，按每 ml RTL Lysis Buffer 加入 20 μ l β -巯基乙醇或 2M DTT，混合液室温可保存 1 周。 β -巯基乙醇/DTT 能打断 RNase 分子间的二硫键，高效灭活 RNASE，提高 RNA 质量。由于 β -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。

实验步骤

A. 培养细胞的收集和裂解

本产品一次可处理 $10^2\sim 10^7$ 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 1×10^7 。

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

- $\leq 2 \times 10^6$ 细胞：加入 350 μ l RTL Lysis Buffer；
- $> 2 \times 10^6$ 细胞：加入 700 μ l RTL Lysis Buffer；

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 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。

- 6 cm 直径的培养皿：加入 350 μ l RTL Lysis Buffer；
- 6-10cm 直径的培养皿：加入 700 μ l RTL Lysis Buffer；

2. 用一次性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。

为减少 DNA 污染，这一步最好用小号注射器(1ml)反复吸打几次。

B. 组织样品的裂解

本产品一次可处理 1~20mg 动物软组织、10~100mg 植物组织。正确的组织量是获得理想产量和纯度的关键。肝脏 10mg，脾脏/胸胰小于 5mg，植物组织 30~100mg。初次使用时，推荐起始动物组织量为 10mg，植物用量为 50mg。根据结果再调整用量。处理含肌纤维样品，如肌肉、皮肤、心脏等，推荐使用 HiPure Fibrous RNA Kit。处理富

含脂类的组织推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器、珠磨仪等工具进行匀浆。

1. **称取组织样品，选择合适的工具进行匀浆，加入适量的 RTL Lysis Buffer。**
 - $\leq 10\text{mg}$: 加入 400 μl RTL Lysis Buffer;
 - $>10\text{mg}$ 组织: 加入 750 μl RTL Lysis Buffer;
2. 室温，14,000 \times g 离心 5 分钟。转移上清至新离心管中，按第 3 步进行操作。

过柱纯化 RNA

3. **加入等倍体积的 RNA Binding Buffer 至裂解液或上清液中，移液枪吸打 5~10 次。**
4. **把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq 700\mu\text{l}$ 混合液至柱子中。**
12,000 \times g 离心 30~60 秒。
5. **(可选:混合液超过 700 μl) 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。
6. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 350 μl Buffer RW1 至柱子上。** 12,000 \times g 离心 1 分钟。
若需彻底去除 DNA，建议订购 (R4911) DNase on Column Kit 进行膜上 DNase 消化。
7. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**
12,000 \times 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。
8. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**
12,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. **倒弃流出液，把柱子装回收集管。** 12,000 \times g 离心 2 分钟。
10. **将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~80 μl 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。
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 30 μl ，若 RNA 产量超过 30 μg ，推荐进行第二次洗脱。本产品只回收 $>200\text{nt}$ 的 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 1.5-20%)，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。
11. **弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C 。**

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 HiPure Fibrous RNA Kit 说明书进行抽提。
- **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。
- **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。