

## 目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
样品的匀浆及打散	5
方案 1:总 RNA 微量提取方案	6
常见问题回答	8

版本: 2014-01

## 简介

RaPure Total RNA Micro Kit 是从微量培养细胞、动物组织、植物、细菌等样品中提取总 RNA 最快速的方法。RaPure Total RNA Micro Kit 适合于从小于  $1 \times 10^6$  培养细胞、5mg 动物软组织， $1 \times 10^8$  细菌中提取总 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，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 20 分钟。纯化的 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。

## 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作用吸附核酸，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。

RaPure Total RNA Micro Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液中匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。裂解液中含有的高浓度异硫氰酸胍使内源性或外源性的 RNase 变性失活，RNA 受到保护不被降解。裂解液经离心去除不溶解的杂质，加入乙醇调节结合条件后，转移至柱子中过滤，RNA 被吸附上柱子的膜上；柱子经 Buffer RW1 洗涤去除蛋白质和其它杂质，再经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后用 RNase Free Water 洗脱出 RNA。得到的 RNA 可用于 RT-PCR、Northern blot、poly-A 纯化，核酸保护和体外翻译等实验。

## 组成

### RaPure Total RNA Micro Kit

产品编号	R4012-01	R4012-02	R4012-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
RTL Lysis Buffer	10 ml	20 ml	120 ml
RNA Binding Buffer*	3 ml	15 ml	2 x 15 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	3 x 310 µg
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

## 保质期

RaPure Total RNA Micro Kits 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下，RTL Lysis Buffer 可能会有沉淀形成，55℃水浴让沉淀完全溶解。Carrier RNA 干粉室温运输和保存，收到产品后把 Carrier RNA 保存于 8~-20℃。

因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装 RNase Free Water 并保存于-20℃，以减少污染。若 RNase Free Water 受到污染，请重新配制或订购。

## 样品的打散和匀浆

样品的打散及匀浆是所有 RNA 提取所必需的步骤。

### A: 液氮处理

在处理液氮的时候，请戴上手套并小心处理。切出适量的组织置于预冷的研钵中，迅速加入液氮，将组织研磨成粉末，然后将粉末倒入预冷的离心管中。（注意预先冷却离心管，否则样品倒入时，液氮沸腾而损失样品。）称重并加入适量的 RTL Lysis Buffer/ $\beta$ -ME，涡旋混匀。由于液氮研磨只能起到打散样品的作用，所以最好再用注射器或机械匀浆器进行匀浆，以减低裂解液的粘稠度。

### B: 机械匀浆器匀浆

机械匀浆器能高效匀浆大部分的组织和细胞。把样品置于合适的玻璃管或离心管中，加入裂解液，把探头插入裂解液中，高速间断匀浆，每次为 15-20 秒直至样品完全匀浆。使用机械匀浆器时，一般组织都可以在一分钟内达到理想的匀浆效果。大部分的机械匀浆器都带有不同大小的探头，小体积的裂解液适合使用较小的探头。

### C: 玻璃珠

玻璃珠高速涡旋也能有效地裂解样品。细胞可用 0.4-0.6mm 酸洗玻璃珠，细菌可用 0.1-0.2mm 酸洗玻璃珠。把样品转移至离心管中，加入适量的玻璃珠，再加入 RTL Lysis Buffer，高速涡旋 5-10 分钟。最好采用珠磨器，如 Fastprep-24(MP)等。珠磨效果取决于样品的大小、细胞壁厚度以及珠磨器功率，详细的操作应根据仪器进行调整。

### D: 玻璃匀浆器

玻璃匀浆器是常用的匀浆工具。能有效处理软组织如肝脏、脾脏、肾、脑等。把样品和适量的裂解液转移至玻璃匀浆器中，上下推磨直至组织块被充分打散。由于玻璃匀浆器只能起到打散样品的作用，所以最好再用注射器匀浆几次，以减低裂解液的粘稠度。

### E: 注射器

处理培养细胞或小量动物柔软组织，如脑、胚胎等可用小型注射器进行抽打。此外，小型注射器还可以同时打断基因组 DNA 和其它高分子物质，起到降低裂解液的粘稠度的作用。注射器匀浆方式是处理细胞最常用的方法。

## 方案 1. RNA 微量速提取

该方案适合于从 $\leq 1 \times 10^6$ 个培养细胞、 $\leq 5\text{mg}$ 动物组织(肝脏,肾脏,脾脏,激光切片,穿刺组织样品)、 $< 20\text{mg}$ 植物/真菌组织样品中提取总RNA。以下离心条件都必须在室温下进行。

### 需要准备材料和工具

- (可选)14.3M  $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -ME)或1M DTT: 使用前,分装适量的RTL Lysis Buffer,每1ml RTL Lysis Buffer加入20 $\mu\text{l}$   $\beta$ -巯基乙醇。RTL Lysis Buffer/ $\beta$ -ME混合液可室温稳定放置1个星期。由于 $\beta$ -ME有较强的气味,可用1 M DTT (Dithiothreitol)代替。用DEPC处理水或灭菌水配制1M DTT,分装保存-20 $^{\circ}\text{C}$ 。按1ml RTL Lysis Buffer加入20 $\mu\text{l}$  1M DTT,该混合液可于室温放置2天。
- 无水乙醇(96-100%)
- 无RNase酶的1.5ml离心管
- 相应的匀浆工具
- (可选)DNase On Column Kit (R4911-01, 50Preps)
- 按瓶子标签所示,加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RW2,室温保存。
- 按瓶子标签所示,加入适量的无水乙醇稀释 RNA Binding Buffer,室温保存。

### Carrier RNA 的用途:

加入适量的RNase Free Water至Carrier RNA管子中,至终浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。涡旋让Carrier RNA充分溶解,然后保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。若处理小于100 $\mu\text{g}$ 动植物组织或 $< 1000$ 个细胞时,Carrier RNA须加到RTL Lysis Buffer/ $\beta$ -ME混合液中至终浓度为4 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。Carrier RNA起着两个作用。首先,Carrier RNA能提高微量的RNA的回收效率;其次是起保护RNA的作用。按Carrier RNA:RTL Lysis Buffer/ $\beta$ -ME = 1:250比例混合。该混合液可在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 稳定放置2天。举例:加入4 $\mu\text{l}$  Carrier RNA至1ml RTL Lysis Buffer/ $\beta$ -ME中。由于Carrier RNA为Poly A结构,可能会影响到RT-PCR的灵敏度,建议根据结果进行调整。

## 第一部分:样品的裂解

### A. 培养细胞 ( $<1 \times 10^6$ )

#### 1. 计算细胞数量, 加入 RTL lysis Buffer/ $\beta$ -ME 至细胞样品中。打散细胞。

**离心收集的细胞:** 弹打或涡旋使细胞松散, 然后加入适量的 RTL lysis Buffer/ $\beta$ -ME。涡旋或吸打混匀。

- $\leq 1 \times 10^6$  细胞: 加入 350 $\mu$ l RTL lysis Buffer/ $\beta$ -ME

- $\leq 1 \times 10^5$  细胞: 加入 100 $\mu$ l RTL lysis Buffer/ $\beta$ -ME

**贴壁细胞的直接裂解:** 彻底吸弃培养液后, 往培养瓶/皿中加入适量的 RTL lysis Buffer。用枪吹打使细胞从壁上脱落, 收集裂解液, 并转移至离心管中。

- 6 cm 直径的培养皿: 加入 350 $\mu$ l RTL lysis Buffer/ $\beta$ -ME

- 处理 $\leq 1 \times 10^5$  细胞的多孔板: 加入 100 $\mu$ l RTL lysis Buffer/ $\beta$ -ME

#### 2. 匀浆(任选一种方案)

- 用一次性的注射器抽打裂解液 5 次匀浆细胞;

- 处理 $<1000$  个细胞时, 只需高速涡旋 1 分钟;

#### 3. 按第四步进行操作。

### B. 动物组织( $<5$ mg)

#### 1. 组织的裂解和匀浆: 把样品放置于匀浆管中, 加入 350 $\mu$ l RTL lysis Buffer/ $\beta$ -ME 进行匀浆。

选择合适的匀浆工具进行匀浆。处理 $<100\mu$ g 组织时, 只需高速涡旋 1 分钟。

#### 2. 室温下, 14,000 $\times$ g 离心 3 分钟。

#### 3. 转移上清液转移至新的 1.5ml 离心管中, 然后按第四步进行操作。

### C. 植物或真菌 (20mg)

#### 1. 转移 $<50$ mg 植物或真菌样品至预冷的 1.5ml 离心管中。用研磨杵和液氮将样品研磨成粉末状。立即加入 400 $\mu$ l RTL lysis Buffer/ $\beta$ -ME 至样品中。涡旋 15~30 秒打散样品, 室温静置 3~5 分钟。

#### 2. 室温下, 14,000 $\times$ g 离心 5 分钟。

#### 3. 小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。按第四步进行操作。

## 第二部分：过柱纯化

4. 加入等倍体积 RNA Binding Buffer 至匀裂液或上清液中，用移液枪吸打 3~5 次或涡旋混匀 15 秒。
5. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移全部的混合液(包括沉淀)至柱子中。8,000 × g 离心 30 秒。

若需彻底去除基因组 DNA 污染，按第六步进行操作。若不需去除基因组 DNA 污染，按第七步进行操作。

6. (可选)彻底去除 DNA(DNase Set, R4911-01B 需另外订购)
  - 6.1. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 350µl Buffer RW1 至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。
  - 6.2. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。按下表配制 DNase 液，混匀。

成分	体积
Digestion Buffer	50 µl
DNase I	10 µl

- 6.3. 把 DNase 反应液加至 RNA 结合柱的膜中央，室温静置 20 分钟。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer RW1 至柱子上，静置 3 分钟。8,000 × g 离心 30 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中，8,000 × g 离心 30 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中，8,000 × g 离心 30 秒。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。10,000 × g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 15~30µl RNase Free Water 至柱子膜中央。静置 1 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
12. 丢去 RNA 柱，把 RNA 保存于-80℃。

## 常见问题回答

现象	原因及解决方法
<b>柱子堵塞</b>	
样品起始用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的先决条件；过多的组织或细胞用量反而会造成产量和纯度的下降。
裂解液加入乙醇之前没有离心	处理动物组织，加入乙醇之前需离心去除杂质。沉淀中含有细胞碎片会引起柱子的堵塞。
<b>RNA 产量低</b>	
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置几分钟后，再离心洗脱；
RNA Binding Buffer 体积不正确	测量裂解液体积，加入乙醇体积不正确
Buffer RW2/RNA Binding Buffer 没有加入乙醇稀释	Buffer RW2/RNA Binding Buffer 使用前，必须加入无水乙醇进行稀释
<b>RNA 降解</b>	
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
样品中 RNA 已降解	样品的不正确贮藏引起 RNA 的降解
<b>DNA 污染</b>	
样品用量太多	减少组织用量。
DNase 没有接触到膜	把 DNase 反应液加到柱子的膜中央。
<b>下游实验结果不理想</b>	
盐类污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟再离心
乙醇污染	确保空柱离心时速度 12,000xg，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落的颗粒是不溶解的，可通过 12,000xg 离心 2 分钟去除。