

目 录

简介-----	2
原理-----	2
试剂盒组成-----	3
保质期-----	3
准备工作-----	4
方案:细胞和组织总 RNA 超微量提取-----	5
常见问题回答-----	8

版本: 2013-01

简介

HiPure Total RNA Nano Kit 是极微量的培养细胞和组织样品($1-10^4$)中提取总 RNA 最简单快速的方法。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 15 分钟。试剂盒采用 DNase 膜上消化技术,可以在提取过程中加入 DNase 至结合柱中消化去除 DNA,可以得到的无 DNA 和 DNase 污染的总 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。

HiPure Total RNA Nano 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,(可选:然后将 DNase 酶消化液直接加到柱子的膜上消化降解 DNA);柱子经 Buffer RW1 洗涤去除蛋白质,DNase,降解的 DNA 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 无 DNA 和 DNase 污染,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。

组 成

HiPure Total RNA Nano Kit

产品编号	R4125-01	R4125-02	R4125-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Nano Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
RTL Lysis Buffer	5 ml	15 ml	30 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
DNase I(10Units/ μ l, Roche)	60 μ l	280 μ l	2 x 280 μ l
DNase Buffer	1.5 ml	1.5 ml	10 ml
Carrier RNA	120 μ g	120 μ g	120 μ g
RNase Free Water	1.8 ml	1.8 ml	10 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure Total RNA Nano Kits 除 DNase I, Carrier RNA 外, 其它组份可在室温下(15-25 $^{\circ}$ C)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8 $^{\circ}$ C。收到产品后, 把 DNase I 和 Carrier RNA 干粉保存于-20 $^{\circ}$ C。低温下, RTL Lysis Buffer 可能会有沉淀形成, 55 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。

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 $^{\circ}$ C, 以减少污染。若 RNase Free Water 受到污染, 请重新配制或订购。

需要准备材料和工具

- **14.3M β -巯基乙醇(β -ME)或2M DTT:** 使用前, 分装适量的RTL Lysis Buffer, 每1ml RTL Lysis Buffer加入20 μ l β -巯基乙醇。RTL Lysis Buffer/ β -ME混合液可室温稳定放置1个星期。 β -ME有较强的气味, 可用2 M DTT [Dithiothreitol]代替。用DEPC处理水或灭菌水配制2M DTT, 分装保存于-20 $^{\circ}$ C。按1ml RTL Lysis Buffer加入10 μ l 2M 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
- 无RNase 酶的枪头
- 手套
- 按瓶子标签所示, 加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RWC 和 Buffer RW2, 并于室温保存。
- 溶解 Carrier RNA: 加入适量的 RNase Free Water 至 Carrier RNA 干粉中, 使之终浓度为1 μ g/ μ l。涡旋使 Carrier RNA 充分溶解, 然后分装保存于-20 $^{\circ}$ C。Carrier RNA 反复解冻的数次不要超过5次。

方案 1.总 RNA 超微量提取

该方案适合于微量的培养细胞($1\sim 10^4$)和动物组织, 激光切片, 穿刺组织样品中提取总 RNA。以下离心条件都必须在室温下进行。

Carrier RNA 的用途:

若处理小于 100 μ g 的动物组织或<1000 个细胞时, Carrier RNA 须加到 RTL Lysis Buffer / β -ME 混合液中至终浓度为 2ng/ μ 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/ β -ME = 1: 500 比例混合。该混合液可在 2-8 $^{\circ}$ C 稳定放置 2 天。举例: 加入 2 μ l Carrier RNA 至 1ml RTL Lysis Buffer/ β -ME 中。Carrier RNA 为 Poly A, 进行反转录时最好不要 Oligo(dT)进行反转录, 而用随机引物进行反转录。进行 Oligo(dT)进行反转录, 可以用酵母 rRNA 代替 Carrier RNA。

1. 收集细胞或组织样品, 并彻底去除培养液。
2. 加入 100 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME/Carrier RNA 至样品中, 用移液枪吸打混匀 10 次。
3. 室温静置 5~10 分钟。
4. 加入 100 μ l 无水乙醇至裂解液中, 用移液枪吸打混匀 10 次。
5. 把 HiPure RNA Nano Column 装在 2ml 收集管中。转移混合液至柱子中。6,000 \times g 离心 1 分钟。
6. 加入 300 μ l Buffer RWC(已加乙醇)至柱子中。6,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer RWC 在使用之前, 须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
7. 丢去收集管和滤液。把 RNA 柱装在新的收集管中。
8. 按下表配制 DNase I 反应液, 轻轻混匀。

成分	用量
DNase Buffer	15 μ l
DNase I(10Units/ μ l)	2 μ l

9. 把 DNase I 反应液加到 RNA 结合柱的膜中央，室温静置 10~15 分钟。
DNase I 反应液须加入柱子膜中央，不要加到壁上。
10. **加 300 μ l Buffer RWC(已加乙醇)至柱子中**，静置 5 分钟。6,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 取出柱子，把滤液重新转移至柱子中。把柱子装回收集管中。6,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。**入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，6,000 \times g 离心 1 分钟。
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. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。**入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，6,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。8,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
15. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。打开柱子的盖子，室温放置 10 分钟以彻底挥发乙醇。
16. **加入 5~15 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央**。室温静置 1 分钟。8,000 \times g 离心 1 分钟。
RNase Free Water 中可以加入 1U 的 RNase Inhibitor，以提高 RNA 的稳定性。
17. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。
文献表明，极低浓度的 RNA 在超低温保存时也会发生降解，建议纯化的 RNA 要尽快使用。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程中所碰到的问题。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
RNA 产量低	
样品匀浆不充分	参照“样品的打散及匀浆”部分，提高样品的裂解效果；减少样品用量或增加裂解液 RTL 的用量和延长匀浆时间；
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。
RNA 的洗脱效率低	DEPC 水需直接加到膜上，并静置几分钟后，再离心洗脱；RNase Free WaterpH 值太低，重新配制；
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。
70%乙醇体积不正确	测量裂解液体积，加入等倍体积的 70%乙醇
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	
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
DNA 污染	
DNase I 消化不彻底	延长 DNase I 消化时间
DNase 没有接触到膜	把 DNase 反应液加到柱子的膜中央。
下游实验结果不理想	
盐类污染	加入 Buffer RW2 后，静置 2 分钟再离心
乙醇污染	确保空柱离心时速度 8,000xg，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。

Note: