

HiPure Fibrous RNA Mini Kit

肌纤维组织 RNA 试剂盒(双柱型)

产品简介

本产品适合于从 $\leq 50\text{mg}$ 难裂解动物组织样品，如皮肤、肌肉、心脏等样品中提取总RNA和miRNA，也适合于从 $\leq 1 \times 10^7$ 培养细胞， $\leq 20\text{mg}$ 动物软组织，以及 $\leq 200\text{mg}$ 简易植物样品中提取RNA和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30分钟。试剂盒结合DNA过滤技术，可高效地过滤去除DNA。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。

产品组成

产品编号	R4115-01	R4115-02	R4115-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RWC	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	5 ml	30 ml	120 ml
Proteinase K Solution	0.3 ml	1.2 ml	6.0 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品可在室温(15~25°C)保存 18 个月。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 RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 该方案可以从培养细胞，动物软组织中提取得到 RNA 和 miRNA，细胞用量不超过 1×10^7 ，肝脏用量 10~20mg，脾脏/胸腺小于 10mg，植物 50~100mg。初次使用时，推荐动物组织量为 10~15mg，植物为 50~100mg。根据结果再调整用量。
- 提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 Buffer RL，按每 1ml Buffer RL 加入 20 μ l β -巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP，混合液室温可保存 1 周。TCEP，中文名为三(2-羧乙基)膦盐酸盐，是一种高效、无异味、不含硫醇基还原剂，可高效灭活核酸酶和防止多酚氧化，可代替 2-巯基乙醇，提高 RNA 的完整性和得率。

实验步骤

1. 样品的裂解 (任选一种方案)

- 用液氮研磨把组织块磨成粉末状，然后转移不超过 50mg 肌肉或皮肤等样品至离心管中，加入 500 μ l Buffer RL，剧烈涡旋混匀；若组织粉末沾在研钵上无法转移，也可把 500 μ l Buffer RL 加到研钵中，进行研磨使裂解液与组织尽快混合，解冻后转移裂解液至离心管中。然后按第 2 步进行操作；
- 把不超过 50mg 组织块放置于离心管中，加入 500 μ l Buffer RL，用机械匀浆器、玻璃匀浆器、或电动研磨器进行匀浆，然后按第 2 步进行操作；
- 小型生物如线虫，寄生虫或少量的组织块等，可把样品转移至离心管中，加入 200 μ l 酸洗玻璃珠(0.4-0.6mm)和 500 μ l Buffer RL，剧烈涡旋 1 分钟以打散样品，然后按第 2 步进行操作；

2. 依次加入 200 μ l RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K (20mg/ml)，颠倒混匀 6-8 次，55 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。

3. 室温下，12,000 \times g 离心 5 分钟。

4. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。把第 3 步得到的上清液转移至 gDNA 过滤柱中。12,000 \times g 离心 1 分钟。

5. 丢弃 gDNA 结合柱。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 次。若需获取 miRNA，加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清液中。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半的混合液至 RNA 柱中。12,000 × g 离心 30-60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，转移剩余混合液至柱子。12,000 × g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500µl Buffer RWC 至柱子中。12,000 × g 离心 30-60 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)至柱子中，12,000 × g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000 × g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心空柱 2 分钟甩干柱子的基质。
12. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30-50µl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
13. (可选) 再加入 30-50µl 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 Mini Column 最小的洗脱体积是 30µl，小于 30µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 30µg，推荐进行第二次洗脱。

HiPure Fibrous RNA Kits 只能结合大于 200nt 的总 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA，tRNA 以及其它小分子 RNA，在纯化过程中被去掉，可起到富集 mRNA 的作用。使用试剂盒得到的 RNA 产量，因不含小分子 RNA，比起其它方法(如 Trizol)的获得的 RNA，产量会低 15-20%。

当 RNA 总量高于 10ug 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10ug 时，A260/230 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3ug，A260/230 会低于 0.6。这是因为 Buffer RTL、RW1 含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值，因此 A260/230 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研究表明，低浓度异硫氰酸胍不影响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下，适量提高样品用量和裂解液用量，提高核酸

浓度（核酸总量>10ugl时，OD260/230 可以明显改善。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多**：减少样品量，过量组织或细胞反而会降低产量和纯度。
- **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 Buffer RL 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。
- **70%乙醇有问题**：用 DEPC 处理水配制 70%乙醇，或用 Buffer RW2 代替。

3. DNA 的污染

- **DNase I 消化**：gDNA 过滤柱可去除 95-99%的 DNA 污染。DNA 去除效果取决样品类型和用量。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。处理肝脏或脾脏样品，用 50%乙醇代替 70%乙醇。