

RaPure Total RNA Micro Kit

微量 RNA 提取试剂盒

产品简介

本产品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。

产品组份

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
Proteinase K Solution	0.3 ml	0.6 ml	3.0 ml
RTL Lysis Buffer	3 ml	15 ml	60 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	20 ml
DNase I (10Units/ μ l, Roche)	60 μ l	280 μ l	2 x 280 ul
DNase Buffer	1.5 ml	6 ml	30 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

保存条件

HiPure Total RNA Nano Kits 除 DNase I, Proteinase K, Carrier RNA 外, 其它组份可在室温下 (15-25°C) 干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8°C。收到产品后, 把 DNase I, Proteinase K 和 Carrier RNA 干粉保存于 -20°C。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°C, 以减少污染。若 RNase Free Water 受到污染, 请重新配制或订购。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中, 加入 4 倍体积无水乙醇, 于室温保存。
- 提升裂解液的变性能力: 使用前分装适量的 RTL lysis Buffer, 按每 1ml RTL lysis Buffer 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。
- 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°C。Carrier RNA 反复解冻的次数不要超过 5 次。

Carrier RNA 作用

- 若处理小于 100 μ g 动植物组织或 <1000 个细胞时, Carrier RNA 须加到 RTL lysis Buffer 中至终浓度为 4ng/ 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 = 1:250 比例混合。该混合液可在 2-8°C 稳定放置 2 天。举例: 加入 4 μ l Carrier RNA 至 1ml RTL lysis Buffer/ β -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。添加了 Carrier RNA 进行提取时, 测量 OD 时, 核酸浓度不代表真实样品浓度, 而且 A260/280 会超过 2.0, 一般在 2.5-2.8。

实验步骤

1. 收集细胞或组织样品，并彻底去除培养液或保护液。
2. 加入 200 μ l RTL Lysis Buffer/Carrier RNA 至样品中，用移液枪吸打混匀 5~10 次。室温静置 3 分钟。
3. 加入 200 μ l Buffer RW2，涡旋混匀 5 秒。
4. 加入 10 μ l Proteinase K 至裂解液中，涡旋混匀 5 秒。室温放置 10 分钟。
5. 把 HiPure RNA Nano Column 装在 2ml 收集管中，转移混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 1 分钟。
6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。加入 300 μ l Buffer RWC(已加乙醇)至柱子中。8,000 \times g 离心 2 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	30 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。
10. 加入 300 μ l Buffer RWC(已加乙醇)至柱子中，静置 1 分钟。8,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 取出柱子，把滤液重新转移至柱子中，并装回收集管中。8,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。8,000 \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。加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，8,000 \times g 离心 1 分钟。

14. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。10,000 × g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
15. 打开柱子的盖子，室温放置 10 分钟以彻底挥发乙醇。
16. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中，加入 10~20μl 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。
RNase Free Water 中可以加入 1U 的 RNase Inhibitor，以提高 RNA 的稳定性。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。
17. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。