

HiPure Universal RNA/DNA Kit

通用型 RNA/DNA 共抽提试剂盒

本产品适合于从培养细胞和组织样品中同时提取总 RNA（包括 miRNA）和 DNA。

产品组份

产品编号	R5114-01	R5114-02	R5114-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	10 ml	30 ml	200 ml
Reagent DX	100 μ l	500 μ l	1.5 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	15 ml
Buffer DW1	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	2 x 20 ml	3 x 50 ml
RNase Free Water	5 ml	30 ml	120 ml
Elution Buffer	1.5 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 18 个月，长期保存时需置于 2~8℃。低温下，Buffer RL 可能会有沉淀形成，55℃水浴让沉淀完全溶解。

实验步骤

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 在 Buffer RWC 中，加入 2 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- (可选) 每 ml Buffer RL 加 20 μ l β -巯基乙醇或 2M DTT，室温可保存 1 周。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml，轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20~-8 $^{\circ}$ C。

A. 培养细胞(<5 $\times 10^6$)

1. 加入 500 μ l Buffer RL 至细胞样品中，打散细胞。

悬浮细胞：离心收集细胞，弹打松散沉淀，加入 400 μ l Buffer RL，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

贴壁细胞：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 450~500 μ l Buffer RL 和 2 μ l Reagent DX。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，转移 400 μ l 裂解液至 1.5ml 离心管中。

2. 加入 200 μ l RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K (20mg/ml)至裂解液。涡旋混匀 15 秒。55 $^{\circ}$ C 振荡温育 15 分钟，按第 3 步进行操作。

B. 固体组织 (动物组织<20mg, 植物样品<100mg)

1. 称取组织样品，选择合适的工具进行匀浆，加入适量的 Buffer RL。

- **[液氮研磨]** 用液氮把组织块磨成粉末，转移样品至离心管中。加入 400 μ l Buffer RL，剧烈涡旋混匀。若组织粉末沾在研钵上无法转移，把~500 μ l Buffer RL 加到研钵中，研磨使裂解液与组织尽快混合，解冻后转移 400 μ l 裂解液至离心管中，按第 2 步进行操作。

- **[机械研磨]** 把组织块放置于匀浆管中，加入~500 μ l Buffer RL 和 2 μ l Reagent DX，用机械匀浆器匀浆或一次性研磨杵进行匀浆，转移 400 μ l 裂解液至离心管中，按第 2 步进行操作。

2. 加入 200 μ l DEPC 水和 20 μ l Proteinase K (20mg/ml)至裂解液。涡旋混匀 15 秒。55 $^{\circ}$ C 振荡温育 15 分钟，14,000 \times g 离心 3 分钟。按第 3 步进行操作。

过柱纯化 DNA

4. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。转移裂解液至 DNA 柱子中。

14,000 × g 离心 2 分钟。转移全部滤液至 2ml 离心管中，按第 11~19 步进行总 RNA 抽提。

5. 把 DNA 柱子装回收集管。加入 500µl Buffer DW1 至柱子上。静置 2 分钟，12,000 × g 离心 30~60 秒。
6. 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。
7. 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。
8. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。
9. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中，加入 30-50µl Elution Buffer 至柱子膜中央。55℃ 放置 5 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
10. (可选)再加入 30-50µl Elution Buffer 至柱子膜中央。55℃ 放置 5 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。

过柱纯化 RNA

11. 收集第四步的滤液，加入 300µl 或 900µl 无水乙醇至滤液中，涡旋混匀 15 秒。
提取总 RNA 时，加入 300µl 乙醇；若需提取 miRNA(<200nt)，加入 900µl 乙醇。
12. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积混合液至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。
13. 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 × g 离心 30~60 秒。
14. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RWC 至柱子上。12,000 × g 离心 30~60 秒。
15. 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。
16. 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。
17. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。
18. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30-100µl 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℃。

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。
- **样品富含脂类物质**：脑，脂肪富含脂类物质，推荐用 HiPure Universal 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。

3. DNA 产量低

- **洗脱不充分**：重复第三步洗脱；
- **样品匀浆不充分**：充分匀浆样品，让组织块完全消失。

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。