

HiPure Universal DNA, RNA, miRNA Kit

通用型 RNA/DNA 共提试剂盒

产品简介

本产品适合于从 $\leq 1 \times 10^7$ 个培养细胞、 $\leq 30\text{mg}$ 动物组织、 $\leq 100\text{mg}$ 常规的植物/真菌组织样品中同时提取得到DNA和总RNA(miRNA)和DNA。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50分钟。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。得到的DNA可直接用于PCR，Southern杂交等。

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 RLC	10 ml	30 ml	200 ml
Proteinase K Solution	0.3 ml	1.2 ml	6.0 ml
Buffer GWP	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RVV*	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 RLC 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。
- 提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 Buffer RLC，按每 1ml Buffer RLC 加入 20μl 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。

A. 培养细胞(<5 × 10⁶)

1. 加入 400~500μl Buffer RLC 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 400μl Buffer RLC，涡旋或用移液枪敲打打散细胞。

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

2. 加入 200μl RNase Free Water 和 20μl Proteinase K Solution (20mg/ml)至裂解液，涡旋混匀 10 秒。55℃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 RLC。

- **[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 μl Buffer RLC，剧烈涡旋混匀。若组织粉末沾在研钵上无法转移，把~500μl Buffer RLC 加到研钵中，研磨使裂解液与组织尽快混合，解冻后转移 400μl 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 RLC，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 RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K Solution (20mg/ml)至裂解液。涡旋混匀 10 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

3. 把 HiPure DNA Mini Column II 装在 2ml 收集管中。转移 600 μ l 裂解液至 DNA 柱子中。14,000 \times g 离心 2 分钟。保存收集管的滤液，按第 10~19 步进行总 RNA 抽提。
4. 把 DNA 柱子装回新的收集管。加入 500 μ l Buffer GWP 至柱子上。静置 2 分钟，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
5. 倒弃滤液，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，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液，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，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心 2 分钟。
8. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中，加入 50-100 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子膜中央。放置 5 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 再加入 50-100 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子膜中央。放置 5 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

过柱纯化 RNA

10. 收集第 3 步的滤液，加入 300 μ l 或 900 μ l 无水乙醇至滤液中，吸打混匀 3-5 次。
提取总 RNA 时，加入 300 μ l 乙醇；若需提取 miRNA(<200nt)，加入 900 μ l 乙醇。
11. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移不超过 750 μ l 混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子上。12,000 \times g 离心 30~60 秒。

14. 倒弃滤液，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，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
15. 倒弃滤液，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，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
16. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心 2 分钟。
17. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30-100 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。
当 RNA 总量高于 10 μ g 时，OD_{260/230} 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 μ g 时，A_{260/230} 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3 μ g，A_{260/230} 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 A_{260/230} 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>10 μ g）时，OD_{260/230} 可以明显改善。