

# R6812 HP Total RNA Kit

## 简易中文步骤

√实验前请按说明书配制和保存以下溶液

➤ 使用【无水乙醇】对 RNA Wash Buffer II 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
R6812-00	8mL
R6812-01	48mL
R6812-02	48mL (每瓶)

➤ B-巯基乙醇是变性 RNase 的关键，在使用前必须加入等份的 Buffer GTC 中，按照每 1mL Buffer GTC 加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇，该混合物可在室温下存放一周。

### 提取步骤：

#### A. 真核细胞和组织

##### a. 样品为细胞

1. 裂解细胞 ( $\leq 1 \times 10^7$  个细胞)，加入 500 $\mu$ l Buffer GTC 裂解细胞，涡旋混匀。对于颗粒细胞，可通过轻弹将细胞彻底打散。然后加入适当体积的 Buffer GTC 涡旋混匀。在使用 Buffer GTC 之前，每 1mL Buffer GTC 需加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。

对于单层（成纤维细胞，内表皮细胞）中成长的组织培养细胞，可直接在培养容器中裂解细胞，后将培养基完全吸出并直接加入 Buffer GTC，对于 T35 烧瓶或 10cm 的器皿，可加入 700 $\mu$ l 的 Buffer GTC，对于较小的容器加入 500 $\mu$ l Buffer GTC 即可，确保加入的 Buffer GTC 可将容器表面的细胞完全裂解。将裂解物全部转移到干净的 1.5mL 离心管中，按照步骤 2 进行。（该方法优于使用胰蛋白酶消化、洗涤，因为它可最大限度减少核酸酶污染引起的 RNA 降解。）

对于悬浮培养细胞，在不大于 1,500rpm (400xg) 下离心 5min，沉淀细胞，弃上清，加入 Buffer GTC，彻底涡旋或上下吸打重悬裂解，然后转移到干净的 1.5mL 离心管中。

2. 根据步骤 2a 或 2b 将样品匀浆裂解。

详细裂解方法请参考英文说明书第 4 页。

如果处理  $\leq 1 \times 10^5$  个细胞，可通过涡旋 1min 匀浆。不完全匀浆可能会导致 RNA 产量明显降低并可能堵塞柱子。

2a. 使用匀浆器将裂解物匀浆 30s，继续步骤 3。

2b. 用带有 RNase 注射器的 20 号针头 (0.9mm 直径) 反复吹打裂解液至少 5 次，继续步骤 3。

3. 将 gDNA Removal Column 套入到 2mL 离心管中，把裂解液转移到柱子中，室温

下, 14,000xg 离心 3min, 弃柱子, 将滤液转移到新的 1.5mL 离心管中, 继续步骤 4。

## b. 样品为组织

1. 取组织 ( $\leq 30\text{mg}$ ), 加入 500 $\mu\text{l}$  Buffer GTC 裂解细胞, 涡旋混匀。

Note: 在使用 Buffer GTC 之前, 每 1mL Buffer GTC 需加入 20 $\mu\text{l}$   $\beta$ -巯基乙醇  
500 $\mu\text{l}$  Buffer GTC 足以裂解约 30mg 的组织 (约 3mm 立方体), 对于超过 20mg 的困难提取组织, 可使用 700 $\mu\text{l}$  Buffer GTC。但是, 不建议使用超过 40mg 的组织。  
对于组织样品, 按照英文说明书第 4 页的匀浆方法之一进行匀浆即可。除非使用液氮, 否则直接在缓冲液 GTC/ $\beta$ -巯基乙醇中匀浆样品, 继续步骤 2。

2. 室温下, 最大速度 ( $> 14,000\text{xg}$ ) 离心 5min;

3. 将 gDNA Removal Column 套入到 2mL 离心管中, 把裂解液转移到柱子中, 室温下, 14,000xg 离心 3min, 弃柱子, 将滤液转移到新的 1.5mL 离心管中, 继续步骤 4。

## RNA 提取

4. 向滤液中加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 涡旋混匀;

5. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 套入到 2mL 离心管中, 把混合液转移到柱子中 (柱子最大容量是 750 $\mu\text{l}$ ), 在室温下 10,000xg 离心 30-60s, 弃滤液;

6. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 重新套回 2mL 收集管中, 重复步骤 5 直至将混合液全部转移过柱;

7. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 重新套回 2mL 收集管中, 加入 300 $\mu\text{l}$  RNA Wash Buffer I, 按上述条件离心, 弃滤液, 如果需要做 DNase I 消化步骤, 请按步骤 8 进行, 如不需要, 则跳过步骤 8, 按步骤 9 继续实验。

8. (选做) DNase I 消化

HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 在没有 DNase 处理的情况下可以除去大部分的 DNA, 因此对于大多数下游实验来说, 没有必要进行 DNase I 消化。但是, 对某些敏感的 RNA 实验可能需要进一步去除 DNA, 以下步骤为膜上 DNase 消化过程。(有关详细信息, 请参考 DNase I 试剂盒, 货号: E1091)

a. 对于每个 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column, 按照下表比例进行配制:

溶液	加入量
OBI DNase I Digestion Buffer	73.5 $\mu\text{l}$
RNase-free DNase I (20 Kunitz unites/ $\mu\text{l}$ )	1.5 $\mu\text{l}$
总体积	75 $\mu\text{l}$

Note:

- 1) DNase I 是相当容易变性的蛋白质, 请不要涡旋 DNase I 混合物, 轻轻颠倒混匀。请在 RNA 提取实验前配备新鲜 DNase I 混合液;
  - 2) OBI DNase I 消化缓冲液也在试剂盒中提供;
  - 3) 常规的 DNase I Buffer 不适合于膜上消化处理;
- b. 向柱子膜基质上加入 75 $\mu$ l 的 DNase I 消化液;
- c. 室温 (25-30 $^{\circ}$ C) 放置 15min。
9. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 重新套回 2mL 收集管中, 加入 400 $\mu$ l RNA Wash Buffer I, (如果做了膜消化步骤, 应室温放置 5min 后离心) 在室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;
10. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 重新套回 2mL 收集管中, 加入 500 $\mu$ l RNA Wash Buffer II, 在室温下 13,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按说明书用无水乙醇稀释

11. 重复步骤 10。
12. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 重新套回 2mL 收集管中, 以 12,000xg 空甩柱子 2min;
13. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-50 $\mu$ l DEPC-treated water 到 RNA 结合柱膜中央, 室温放置 2min;
14. 在室温下, 10,000xg 离心 1min 洗脱 RNA。

Note: 如果样品中的 RNA 含量较高, 柱子能与其中的 80%RNA 结合; 用 DEPC-treated water 二次洗脱可提高产量; 在 65 $^{\circ}$ C 水浴加热 DEPC-treated water 后加入柱子孵育 5min 洗脱可提高产量。

## B. 从纤维组织中提取 RNA

骨骼肌、心脏和主动脉组织等组织的 RNA 提取更加困难, 因为它们含有可收缩的蛋白质、结缔组织和胶原蛋白。为了更有效地分离 RNA, 我们强烈推荐使用 E.Z.N.A.<sup>®</sup> Tissue RNA Kit (货号: R6688)

1. 将 300 $\mu$ l Buffer GTC 加入装有组织 ( $\leq$ 25mg) 的样品管, 在使用 Buffer GTC 之前, 每 1mL Buffer GTC 需加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。按照英文说明书第 4 页的方法进行匀浆, 如果使用液氮, 可直接在 Buffer GTC/ $\beta$ -巯基乙醇中裂解, 然后按照步骤 2 进行。
2. 加入 590 $\mu$ l DEPC Water 稀释并混匀;
3. 加入 10 $\mu$ l RNase-Free Proteinase K (客户自备), 涡旋混匀。在 55 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 期间取出样品混匀 2 次。
4. 在室温下, 14,000xg 离心 5min, 将 gDNA Removal Column 套入到 2mL 收集管

中，转移上清液至 gDNA Removal Column，室温下 14,000xg 离心 1min，弃柱子，将滤液转移至新的 1.5mL 离心管；

5. 加入 0.5 倍体积的无水乙醇，涡旋混匀；
6. 按照“方案 A”中的“RNA 提取”步骤进行即可。

### C. 从血液中提取 RNA

Note: 该方案提取的 RNA 的量足够用于 RT-PCR。为了更有效地分离 RNA，我们强烈推荐使用 E.Z.N.A.<sup>®</sup> Blood RNA Kit (货号: R6814)。以下所有步骤均在室温下进行。

1. 将 100 $\mu$ l 的全血样品转移到 1.5mL 离心管中；
2. 加入 300 $\mu$ l Buffer GTC/ $\beta$ -巯基乙醇，最大速度涡旋混匀 20s；
3. 加入 590 $\mu$ l DEPC Water 稀释并混匀；
4. 加入 10 $\mu$ l RNase-Free Proteinase K (客户自备)，涡旋混匀。在 70 $^{\circ}$ C 孵育 10min，期间取出样品混匀 2 次。
5. 在室温下，14,000xg 离心 5min，转移上清液新的 1.5mL 离心管中；
6. 加入 0.5 倍体积的无水乙醇，涡旋混匀 20s，按照“方案 A”中的“RNA 提取”步骤进行即可。

### D. 细菌 RNA 的提取

E.Z.N.A.<sup>®</sup> HP Total RNA Kit 可以从细菌培养物中提取 RNA。适用于在对数生长时期的细胞。在 600nm 处测量，OD 为 0.5-1.0 对应大概  $10^9$  个细胞/mL。该方法适用于不超过  $10^9$  个细胞。以下离心步骤均在室温进行。

1. 收集细胞，并加入 100 $\mu$ l TE Buffer/溶菌酶在室温下孵育 10min；以 4,000xg 离心 5min 收集  $10^9$  个细胞，弃上清。加入 100 $\mu$ l 含有溶菌酶 (客户自备) (革兰氏阴性菌 0.5mg/mL，革兰氏阳性菌 4mg/mL) 的 TE Buffer (客户自备) 中，室温下孵育 7min；
2. 加入 500 $\mu$ l Buffer GTC/ $\beta$ -巯基乙醇，上下颠倒混匀数次。在使用 Buffer GTC 之前，每 1mL Buffer GTC 需加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。
3. 在室温下，14,000xg 离心 5min，将 gDNA Removal Column 套入到 2mL 收集管中，转移上清液至 gDNA Removal Column，室温下 14,000xg 离心 1min，弃柱子，将滤液转移至新的 1.5mL 离心管；
4. 加入 0.5 倍体积的无水乙醇，涡旋混匀；
5. 按照“方案 A”中的“RNA 提取”步骤进行即可。

### 真空抽提方案:

1. 按照说明书, 将 HiBind<sup>®</sup> RNA V-Spin column 与真空抽滤盒连接;
2. 将匀浆好的样品加入到 HiBind<sup>®</sup> RNA V-Spin column 中;
3. 打开真空泵, 使样品全部抽滤过柱, 关闭真空泵;
4. (选做) 如果需要进行 DNase I 消化步骤, 按照“方案 A”中“步骤 8”进行;
5. 加入 750 $\mu$ l RNA Wash Buffer I, 打开真空泵, 使溶液完全抽滤过柱, 关闭真空泵;
6. 加入 1000 $\mu$ l RNA Wash Buffer II, 打开真空泵, 使溶液完全抽滤过柱, 关闭真空泵;
7. 将柱子套入到 2mL 收集管中, 在离心机上空柱子离心 2min 干燥;
8. 将柱子套入到干净的 1.5mL 离心管中, 加入 30-50 $\mu$ l 无 RNase 的水, 静置 1-2min, 离心 1min 洗脱 RNA。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准