



RNeasy Plus Micro Kit
- Chinese protocol(从动物和人类细胞中提取RNA)

2012年06月

胡川

本试剂盒适用于配合gDNA去除柱从以下样本中纯化total RNA:

- 动物和人类细胞($\leq 5 \times 10^5$)
- 动物和人类组织(≤ 5 mg)
- 显微切片
- 对RNA样本回收和纯化

确定正确的起始样本量：

- 为了获得最好的RNA的产量和纯度，使用正确的起始样本量非常重要。最大化产量取决于以下条件：
 - 不同RNA含量的细胞类型
 - gDNA去除柱的DNA消化能力
 - RNeasy MinElute spin column的RNA结合力(45 µg RNA)
 - 充分裂解细胞所需要的Buffer RLT的量

- 另外，亚细胞碎片会减弱gDNA去除柱以及RNeasy MinElute spin column的结合力。如果处理的细胞类型不在Table 2的列表中并且没有该细胞RNA含量的数据，我们建议细胞数量不要超过 5×10^5 。
- 上gDNA去除柱时务必不要过量，否则将会导致DNA残留。不要过量上RNeasy MinElute spin column，否则这将会降低RNA的产量和纯度。
- 细胞计数是确定起始样本量最准确的方法。作为参考，Table 4给出了HeLa细胞在不同的培养板中铺满时的细胞数目。

Table 2. Typical yields of total RNA with the RNeasy Plus Micro Kit

Sample type	Yield of total RNA [†] (μg)
Cell cultures (5 x 10⁵ cells)	
■ NIH/3T3	5
■ HeLa	7.5
■ COS-7	17.5
■ LMH	6
■ Huh	7.5
Mouse/rat tissues (5 mg)	
■ Embryo (13 day)	10
■ Brain	2–5
■ Kidney	10–15
■ Liver	20–30
■ Spleen	15–20
■ Thymus	20–25
■ Lung	5–10

[†] Amounts can vary due to factors such as species, developmental stage, and growth conditions. Since the RNeasy Plus Micro procedure enriches for mRNA and other RNA species >200 nucleotides, the total RNA yield does not include 5S rRNA, tRNA, and other low-molecular-weight RNAs, which make up 15–20% of total cellular RNA.

Table 4. Growth area and number of HeLa cells in various culture vessels

Cell-culture vessel	Growth area (cm ²)*	Number of cells†
Multiwell plates		
■ 96-well	0.32–0.6	4–5 x 10 ⁴
■ 48-well	1	1 x 10 ⁵
■ 24-well	2	2.5 x 10 ⁵
■ 12-well	4	5 x 10 ⁵
■ 6-well	9.5	1 x 10 ^{6‡}
Dishes		
■ 35 mm	8	1 x 10 ^{6‡}
Flasks		
■ 40–50 ml	25	3 x 10 ^{6‡}

* Per well, if multiwell plates are used; varies slightly depending on the supplier.

† Cell numbers are given for HeLa cells (approximate length = 15 μm), assuming confluent growth. Numbers will vary for different kinds of animal and human cells, which vary in length from 10 to 30 μm.

‡ This number of cells exceeds the maximum binding capacity of the RNeasy MinElute spin columns. To process this many cells, split the lysate into appropriate aliquots (≤5 x 10⁵ cells each) and load them onto separate RNeasy MinElute spin columns.

开始前重要提示:

- 如果第一次使用RNeasy Plus Micro Kit, 请阅读英文Handbook中Page11中的“Important Note”
- 如果第一次准备RNA样本, 请阅读英文Handbook中Page39中的附录A
- 如果使用TissueRuptor进行组织研磨, 请确保熟悉并按照*TissueRuptor User Manual* 和 *TissueRuptor Handbook*操作。
- 细胞可以被储存在-70°C或立即进行操作。在冷藏前需要确定细胞数目。冷冻的细胞可在第2步, 用手指轻弹管壁, 使其温和解冻。第3步得到的裂解液可以在-70°C下保存数月。冷冻的裂解液可在37°C下水浴直至细胞裂解物和盐完全溶解。避免过长时间孵育, 否则将会导致RNA降解。如果有沉淀, 3000–5000 x *g*下离心5 min。收集上清至一个新的无RNA酶的玻璃或塑料管中, 继续第4步。

- 保存于RNAprotect Cell Reagent中的细胞也适用于本操作。收集全部的样本（包括沉积在容器底部的所有物质）至离心管。5000 x *g* 离心5 min，将上清吸去（离心前将样本融解）。立即进行第2步。
- Buffer RLT Plus 和Buffer RW1含有胍盐，因此不要与含有漂白剂的消毒液接触。安全信息请见Handbook第6页。
- 所有的操作步骤在室温下进行(15–25°C)。所有的操作必须迅速。
- 所有的离心步骤在 20–25°C 下于标准小型离心机上操作。请确保离心机的温度不要低于20°C。

开始前准备工作:

- 如果从富含RNA酶的细胞系中纯化RNA，我们推荐您操作前在Buffer RLT Plus中加入 β -mercaptoethanol (β -ME)。每1 ml Buffer RLT Plus加10 μ l β -ME。注意在通风橱中操作，并穿着防护服。含有 β -ME的Buffer RLT Plus 可在室温(15–25°C)下储存至多1个月。或者，加20 μ l 2 M的 dithiothreitol (DTT) 溶液至 1 ml Buffer RLT Plus中。2 M DTT水溶液需要新鲜配置，或者分装冻存。含有DTT的 Buffer RLT Plus 可在室温下储存至多1个月。
- 当处理少于500个细胞时，Carrier RNA需在裂解前加入裂解液中（见Handbook第15页，中文操作手册最后有注解）。在第一次使用前，用1 ml RNase-free water溶解Carrier RNA (310 μ g)。–20°C下储存该溶液，新鲜配置稀释液。储存液的浓度为310 μ g/ml (i.e., 310 ng/ μ l)。将5 μ l 的储存液加入至34 μ l Buffer RLT Plus中，并吸打混匀。吸取6 μ l的稀释液至54 μ l Buffer RLT Plus中，获得4 ng/ μ l的工作液。第3步操作时在裂解液中加入5 μ l该工作液。如果纯化好的RNA是用来做基于oligo-dT 的RNA模板扩增，则不可加Carrier RNA。

- **Buffer RPE**以浓缩液的形式提供，在第一次使用前，加4倍体积的乙醇(96–100%)至瓶身指示处。
- 在首次使用本试剂盒前，准备80%乙醇（ 24 ml 乙醇 (96–100%) 和6 ml **RNase-free water**（提供）混匀 ）。本操作也需要70% 的乙醇，可用蒸馏水（未提供）稀释乙醇 (96–100%)得到
- **Buffer RLT Plus** 在储藏中可能会出现沉淀。如有必要，可温浴使其溶解，然后是问下保存。

1、按照**1a**或**1b**的步骤收集细胞。

1a. 悬浮培养的细胞（不要超过 5×10^5 ）：

确定细胞的数量：取含适量数量的细胞的培养液于离心管中（未提供）， $300 \times g$ 下离心5 min，小心吸去所有的上清，继续第2步操作

注意：细胞培养液去除不全会抑制后续细胞裂解并稀释裂解产物，影响DNA去除的条件和RNA纯化。以上情况均会减少RNA的产量降低RNA的纯度。

1b. 单层培养的细胞（不要超过 5×10^5 ）：

细胞在培养器皿中单层培养的，可直接在细胞培养器皿中裂解（至多直径为10 cm的单层细胞），也可用胰蛋白酶处理后收集细胞，然后裂解。如果是细胞培养瓶中生长的单层细胞，必须先用胰蛋白酶处理。

直接裂解细胞：

确定细胞数量。完全吸去细胞培养液，立即进行第2步操作。

注意：细胞培养液去除不全会抑制后续细胞裂解并稀释裂解产物，影响DNA去除的条件和RNA纯化。以上情况均会减少RNA的产量降低RNA的纯度。

胰蛋白酶处理里后收集细胞：

确定细胞数目。吸去细胞培养液，用PBS洗涤细胞。吸打PBS，加0.10–0.25%的胰蛋白酶在PBS中。待细胞从板子或者瓶子上分离后，加细胞培养液（含有血清，可以抑制胰蛋白酶活性），将细胞转移到无RNA酶的玻璃或塑料离心管（未提供）中， $300 \times g$ 下离心5 min。彻底吸去上清，接着按照第2步操作。

注意：细胞培养液去除不全会抑制后续细胞裂解并稀释裂解产物，影响DNA去除的条件和RNA纯化。以上情况均会减少RNA的产量降低RNA的纯度。

2. 加Buffer RLT Plus 处理细胞。

手弹管壁，让沉淀的细胞重悬。加入350 µl Buffer RLT Plus。涡旋或吸打混匀，继续第3步操作。如果处理的细胞 $\leq 1 \times 10^5$ cells，则加75 µl Buffer RLT Plus。这样可以在更小的管中操作。反复吸打裂解细胞。

注意：细胞重悬不彻底会导致细胞裂解不充分，从而降低RNA得率。

单层培养细胞直接裂解，直接加350 µl Buffer RLT Plus至细胞培养盘上。用rubber policeman收集裂解产物。转移裂解产物至一个微型离心管（未提供）。涡旋或吸打混匀。确保在第3步操作之前无可视的细胞块。如果处理的细胞 $\leq 1 \times 10^5$ cells，则加75 µl Buffer RLT Plus。这对多孔板和细胞培养盘操作来说比较必要。反复吸打裂解细胞。

3. 按照3a\3b\3c进行细胞裂解产物匀浆化操作。

起始样本匀浆化操作的更多详情可见英文Handbook第13页。如果操作 $\leq 1 \times 10^5$ cells，可涡旋震荡1 min来获得匀浆。在匀浆化操作后继续第4步操作。

注意：如果在第2步加了75 μ l Buffer RLT Plus，转移裂解产物至1个新的1.5 ml离心管，用Buffer RLT Plus调节体积至350 μ l。涡旋1 min获得匀浆，继续第4步操作。

注意：如果操作 < 500 cells，需要在匀浆化前加入20 ng carrier RNA (5 μ l 的4 ng/ μ l 溶液) 至裂解产物中。按照本说明第9页中说明准备carrier RNA。

注意：不完全匀浆化将会导致RNA得率降低，并且导致gDNA去除柱和RNeasy MinElute spin堵塞。用TissueRuptor或QIAshredder来进行匀浆化操作得到的RNA得率比用针头和针筒处理得到的高。

3a. QIAshredder spin柱（未提供）安装在1个新的 2 ml 收集管上，直接吸取裂解产物于柱上，全速离心2 min，继续第4步操作。

3b. 将TissueRuptor的一次性探头放在裂解液中，全速操作，直至得到匀浆（通常需要30 s）。继续第4步操作。

注意：在操作中避免破坏TissueRuptor和一次性探头，请确保在操作过程中，探头一直在Buffer液面以下。

3c. 至少反复5次通过一个20-gauge 的针头（直径0.9 mm）的吸打。该针头需要装在一个无RNA酶的针筒上。继续第4步操作。

4. 将匀浆转移至1个gDNA去除柱（装在一个2 ml的收集管上，收集管提供）上。
 $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)的条件下离心30 s。丢弃柱子，保存流出液。

注意：确保离心后柱膜上没有残留液体。如有必要，重复离心的步骤，直至柱膜上无残留液体。

以下的步骤为纯化分子量大于200个碱基的RNA分子。如需纯化总RNA，包括小RNAs(如miRNA)，用英文Handbook第45页附录D中D1-D6的操作替代本操作中5-11的操作。

5.加1倍体积的70%的乙醇(通常为350 μ l) 至第4步得到的流出液中，吸打混匀。不要离心。立即进行第6步操作。

注意：需加入的70%乙醇的体积可能少于350 μ l，在匀质化阶段以及DNA去除阶段会有液体损耗。

注意：从某个确定的细胞系中纯化RNA，有些可视的沉淀可能在加入乙醇后生成。这不会影响后续操作。

6. 转移样本，包括可能产生的沉淀，至1个RNeasy MinElute spin column（装在1个2 ml的收集管上，收集管已提供）。小心盖上盖子， $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)离心15 s。丢弃流出液。

可选操作：如果需要回收蛋白，可将流出液放于冰上，按英文Handbook第47页附录E中E1-E5的操作步骤操作。将收集管留着第7步继续使用。

7. 加700 µl Buffer RW1 至RNeasy MinElute spin column上。小心盖上盖子， $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)离心15 s。丢弃流出液。

保留收集管，第8步继续使用。

注意：在离心后，小心将RNeasy MinElute spin column移去，避免柱子接触到流出液。确保将收集管里的液体彻底清空。

8. 加500 µl Buffer RPE 至RNeasy MinElute spin column上。小心盖上盖子， $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)离心15 s，洗涤柱膜。丢弃流出液。

保留收集管，第9步继续使用。

注意： Buffer RPE 以浓缩液的形式提供。确保在使用前乙醇已经加入Buffer RPE（本操作说明第10页）。

9. 加 500 μ l 80% 的ethanol至 RNeasy MinElute spin column。小心盖上盖子， $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)下离心2 min，洗涤柱膜。丢弃流出液和收集管。

用无水乙醇(96–100%)和本试剂盒提供的无RNA酶水配置80%的乙醇。

注意：离心后，小心从收集管移出RNeasy MinElute spin column，不要接触到流出液。否则将会有乙醇被引入样本。

10. 将RNeasy MinElute spin column 放在一个新的2 ml的收集管里（提供）。打开盖子，全速离心5 min。丢弃流出液和收集管。为了避免破坏盖子，在相邻的管子间至少留1个空位。将盖子的方向超转子相反的方向摆放（例如，如果转子顺时针方向旋转，则将盖子逆时针摆放）

将柱膜充分干燥至关重要，因为残留的乙醇会干扰下游反应。开盖离心是为了确保没有乙醇带入下游RNA洗提步骤。

11.将RNeasy MinElute spin column 置于一个新的1.5 ml收集管（提供）。直接加14 μ l RNase-free water 在柱膜中心。小心盖上盖子，全速离心1 min洗提RNA。

最小可以用10 μ l RNase-free water 来做洗提，以获得更高的RNA浓度，但RNA得率将会减少20%左右。不要用小于10 μ l 的RNase-free water，因为柱膜不能被充分湿润。RNeasy MinElute spin column存在2 μ l的死体积，即14 μ l的RNase-free water 加入后，可以获得12 μ l 的洗提液。

使用纯化好的RNA进行RT-PCR以及定量RT-PCR，QIAGEN提供了最优化的范围，即用型试剂盒提供了高特异性和灵敏度的结果。详细的信息，请访问 www.qiagen.com/PCR。

对微量RNA进行全转录组扩增（WTA），我们推荐QuantiTect Whole Transcriptome Kit. For details, visit www.qiagen.com/goto/WTA。

RNeasy Plus Micro Kit 含有 poly-A RNA，可作为carrier RNA使用。当加入微量样本的裂解液时，此Carrier RNA在某种程度上会提高total RNA的得率。当处理多于500个细胞或大于2 µg 的组织时无需使用Carrier RNA。

已经在多种不同的RT-PCR 系统中证实，在纯化total RNA时加入的微量poly-A RNA作为Carrier RNA不会对下游RT-PCR产生干扰，即使是在oligo-dT 作为引物进行反转录时也没有问题。经过比较得知，反转录反应中通常会含有过量的oligo-dT 引物，微量的poly-A作为Carrier RNA没有产生作用。

然而，以poly-A RNA作为Carrier RNA纯化出来的total RNA与以oligo-dT 为引物扩增mRNA的protocol不兼容。包括采用Eberwine法以及QuantiTect® Whole Transcriptome Kit (本试剂盒采用random和 oligo-dT primer的预混液)，均不适用。当采用Eberwine法的时候，请购买其他类型的RNA作为Carrier RNA。请注意，tRNA和其他<200 个碱基的RNA不可以作为Carrier RNA使用。通常情况下，也可以购买细菌的核糖体RNA (e.g., 如从 Roche购买, cat. no. 206938)替代试剂盒内的poly-A RNA，也可取得较好的结果。但是，如果是使用QuantiTect Whole Transcriptome Kit 来做mRNA的扩增，所有的Carrier RNA均不能使用。