

HiPure Universal RNA Mini Kit

通用型 RNA 抽提试剂盒

本产品适合于从各种生物样品中提取高纯度总 RNA。试剂盒结合了两种高效的 RNA 抽提技术，将一步法的 RNA 抽提技术和硅胶柱 RNA 纯化技术结合起来，可最大程度上提高 RNA 的纯度。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。

产品组份

产品编号	R4130-01	R4130-02	R4130-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
MagZol Reagent	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

版本号: 2018-01

保存条件

本产品除 Magzol Reagent 外，其它组份可在室温保存 18 个月。Magzol Reagent 室温运输，收到产品后保存于 2~8℃。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积的无水乙醇，于室温保存。
- (可选)氯仿

A: 实验步骤(高纯方案)

1. 按下列方法对样本进行匀浆

- ** 动物组织: 称取 10~60mg 组织到离心管中, 加入 1ml MagZol Reagent, 立即用研磨杵或匀浆器进行充分匀浆。
- ** 植物和真菌: 用液氮将样品研磨成粉末, 取 50-150mg 粉末, 立即加入 1ml MagZol Reagent, 涡旋打散样品。
- ** 贴壁细胞: 吸弃培养液, 加入 1ml MagZol™ Reagent, 移液枪吸打 3-5 次, 让细胞充分裂解。
- ** 悬浮细胞: 500 × g 离心收集细胞(5×10^6 细胞), 去除培养液。涡旋或弹打松散细胞团。加入 1ml MagZol Reagent, 移液枪吸打 3-5 次。
- ** 细菌: 离心收集(1×10^8 细菌), 加入 100 μ l TE/lysozyme 处理 10 分钟, 然后加入 1ml MagZol Reagent, 涡旋 1 分钟。

2. 室温放置 5~10 分钟。

3. 加入 200 μ l 氯仿至裂解液中, 用手剧烈振荡 15 秒, 室温放置 3 分钟。

氯仿是易制毒危险品, 是国家管制化学品, 可按简易方案进行操作, 这一步振荡必须快速而剧烈, 缓慢颠倒混匀会导致抽提不充分。不能用涡旋取代振荡, 涡旋混匀会带来更多的 DNA 污染。

4. 4°C, 12,000 × g 离心 15 分钟。

5. 转移上清液至新的离心管中, 加入 0.5 倍(或 1.5 倍)体积无水乙醇。涡旋 10 秒。

若需获取小分子 RNA, 加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清液中。

以下离心均在室温下进行

6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq 750\mu$ l 混合液至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。

7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子。12,000 × g 离心 30~60 秒。

若需要彻底去除 DNA 污染, 建议订购我司的 DNase on Column Kit (R491) 进行膜上 DNase 消化。

8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer RW2 至柱子中, 12,000 × g 离心 30~60 秒。

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。

9. (可选)倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer RW2 至柱子中, 12,000

× g 离心 30~60 秒。

10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。
11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~100 μl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
12. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

B: 简易方案(无氯仿抽提)

由于省略了氯仿抽提步骤，进行该方案操作时，动物组织用量不要超过 30mg，细胞用量不要超过 5×10^6 。

1. 按实验步骤的第 1~2 步进行操作，用 0.6~0.8ml MagZol Reagent 处理生物样本。
2. 4°C，12,000 × g 离心 10 分钟。
3. 转移上清至 1.5ml 离心管中，加入等倍体积的 Buffer RW2 至上清中，涡旋混匀 10 秒。
4. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 ≤750μl 混合液至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。

若混合液体积超过 750ul，重复过柱。

5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 350μl Buffer RW1 至柱子中，静置 2 分钟，12,000 × g 离心 30~60 秒。

由于该方案没有氯仿抽提，DNA 污染相对较多，推荐订购我司的 DNase on Column Kit 进行膜上 DNase 消化，以彻底去除 DNA。

6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × g 离心 30~60 秒。

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。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × g 离心 30~60 秒。

8. 倒弃滤液，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，加入 20~100μl 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°C。

常见问题

1. 提取的 RNA 产量低或降解了？

- **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。
- **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。建议使用 RNASafer Reagent 来保存固体组织样品；
- **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，加入等倍体积的 50%乙醇代替无水乙醇。

2. DNA 的污染

- **上清液转移得太多：**建议只转移上清 400~450 μ l，中间层富含 DNA。
- 样品用量太多。
- 样品中含有丰富的基因组 DNA，样品在 MagZol™ Reagent 裂解匀浆后，按 1ml MagZol™ Reagent 加入 5 μ l 冰醋酸，然后再加入氯仿抽提。
- 加入氯仿时没有剧烈振荡，或采用涡旋代替振荡；
- 氯仿过量加入；
- 进行 RT-PCR 时，建议使用 DNase I 消化去除残留的 DNA。

3. 纯度低(OD260/OD280<1.65)

- 加入氯仿时没有剧烈振荡，不要用涡旋或颠倒混匀
- 氯仿过量加入
- 裂解不够充分，匀浆后须室温放置 5 分钟
- 减少样品用量；