

## 目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1:细菌总 RNA 抽提	5
方案 2:酵母总 RNA 抽提	7
方案 3:膜上 DNASE 消化	9
常见问题回答	10

2017年12月01日

## 简介

HiPure Bacterial RNA Kit 适合于从细菌培养液中提取高纯度总 RNA。HiPure Yeast RNA Kit 适合于从酵母培养液中提取高纯度的总 RNA。试剂盒结合高效 Magzol Reagent 一步法抽提试剂和硅胶柱纯化技术，只需 40 分钟便可完成高纯度总 RNA 的提取工作。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。

试剂盒	Bacterial RNA Kit	Yeast RNA Kit
编号	R4181	R4182
样品用量	1-3ml 指数期的菌液 $1 \times 10^9$	1-3ml 指数期的酵母 $5 \times 10^7$ 1-3ml 指数期的菌液 $1 \times 10^9$
柱型	1.5ml 柱	1.5ml 柱
结合能力	150 $\mu$ g	150 $\mu$ g
破壁方法	溶菌酶 玻璃珠(0.1-0.2mm)	热酶法 玻璃珠(0.1-0.6mm)

## 原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。

HiPure Bacterial/Yeast RNA Kit 结合了 RNA 抽提两种应用最广泛的技术：一步法抽提技术和硅胶柱纯化技术。细菌或酵母经溶菌酶或破壁酶去除细胞壁后，经一步法抽提试剂 Magzol Reagent 裂解液匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。由于裂解液中含异硫氰酸胍和酚，内源性或外源性的 RNASE 变性失活，RNA 被保护起来。加入氯仿抽提去除 DNA 和蛋白质，转移上清液并用乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，RNA 被吸附在柱子的膜上，而杂质不被吸附而去除。柱子经 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后用 RNase Free Water 洗脱出 RNA。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。

## 组 成

### HiPure Bacterial RNA Kit

产品编号	R4181-01	R4181-02	R4181-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Lysozyme	10 mg	90 mg	400 mg
Buffer STE	1.5 ml	10 ml	30 ml
Protease Dissolve Buffer	2 ml	3 ml	15 ml
Glass Beads(0.1~0.2mm)	3 g	20 g	90 g
MagZol Reagent	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

## 保 质 期

HiPure Bacterial RNA Kit 除 Magzol Reagent 和 Lysozyme 外，其它组分可在室温下 (15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。Magzol Reagent 和 Lysozyme(干粉)保存于 2-8℃。

## 组 成

### HiPure yeast/Bacterial RNA Kit

产品编号	R4182-01	R4182-02	R4182-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Glass Beads(0.1~0.6mm)	6 g	30 g	150 g
DNase I	120 ul	10 mg	5 x 10 mg
DNase Buffer	1 ml	6 ml	30 ml
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Buffer ATL	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer PHC	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer GXP2*	6 ml	20 ml	100 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

## 保 质 期

HiPure Yeast/Bacterial RNA Kit除Buffer PCI和DNase I外,其它组分可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。Buffer PCI和DNase I采用室温运输,收到产品后,把DNase I保存于-20~8℃, Buffer PCI保存于 2~8℃,。

## 方案 1. 细菌总 RNA 提取(R4181)

该方案适合于从 $<1 \times 10^9$ 细菌中提取总 RNA。由于细菌的 mRNA 不携带 Poly A 和 5' 加帽结构, 其 mRNA 表达水平可能会在离心收集过程或溶菌酶消化过程中发生改变。如果目标基因对外源刺激比较敏感的话, 推荐使用 HiPure Yeast RNA Kit。该试剂盒采用热酚法和珠磨法, 直接裂解细菌或微生物, 可避免溶菌酶处理过程, 引起的 RNA 表达水平的应激调整。

### 细菌的用量 ( $<1 \times 10^9$ )

细菌生长情况可以通过分光光度计进行测量。由于不同仪器之机的差别和各种生长条件的影响, 我们很难给出 OD 值与细菌数量之间的精确可靠的关系。例如, 每毫升含  $1 \times 10^9$  个细菌的培养液, 稀释 4 倍后, 在 Beckman DU-40 测量时, OD600 为 0.125; 在 DU-7400 测量时, OD600 为 0.25。因此我们建议使用平板计数法来校准仪器测量的 OD 值。测量 OD 值时, 需对样品进行稀释或浓缩, 以确保读数在 0.05-0.3 的可信区间内。不同的培养条件以及不同细菌的 RNA 含量差别很大, 我们建议在初次提取时, 细菌的用量为  $2 \times 10^8$ , 然后再根据结果进行调整。

### 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 氯仿
- (可选: 膜上 DNASE 处理) DNase On Column Kit
- 用无水乙醇稀释 Buffer RVW2, 并于室温保存。
- 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Lysozyme, 终浓度为 50mg/ml,-20 °C 保存。

### 实验步骤

1. 选择合适条件过夜培养细菌。
2. 第二天, 按 1:50 的比例接种至新培养基中培养 6~8 小时, 如果生长太慢, 可以加大接种量。
3. 取 1~1.5ml 培养液至 2.0ml 离心管中,  $13,000 \times g$  离心 2 分钟, 除去上清液。

4. 加入 100 $\mu$ l Buffer STE 和 30 $\mu$ l Lysozyme 到细菌沉淀中。涡旋重悬细菌，室温放置 10 分钟。
5. 加入 1ml MagZol Reagent 至细菌重悬液上，涡旋混匀 15 秒。室温放置 5-10 分钟让细菌充分裂解。
6. (可选)处理革兰氏阴性细菌可以省略这一步。处理革兰氏阳性细菌时，再加入 0.3g 玻璃珠(约~0.3ml)至裂解液中，2500~3000rpm 涡旋混匀 5~10 分钟，静置 1 分钟后，转移样品至新的离心管中。

由于该方法采用珠磨裂解菌体，涡旋速度和时间对产量有明显的影响，部分振荡仪达到 2000rpm，因而会导致产量下降。

7. 加入 200 $\mu$ l 氯仿至裂解液中。用手剧烈振荡 15 秒，室温静置 3 分钟。
8. 4 $^{\circ}$ C，12,000  $\times$  g 离心 15 分钟。
9. 转移上清液至新的离心管中，加入等体积的 Buffer RW2 至上清液中，涡旋 10 秒。
10. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。8,000  $\times$  g 离心 30 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。8,000  $\times$  g 离心 30 秒。
12. (可选)参照第 8 页进行膜上 DNASE 消化以彻底去除 DNA 污染。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 650 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。8,000  $\times$  g 离心 30 秒。
14. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。10,000  $\times$  g 离心空柱 2 分钟甩干柱子的基质。
15. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 30-50 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
16. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80 $^{\circ}$ C。

## 方案 2. 酵母及微生物总 RNA 提取(R4182)

该方案采用热酚法和物理方法裂解酵母或细菌，适合于从  $1 \times 10^7$  酵母细胞中提取高纯度的总 RNA，从  $1 \times 10^9$  细菌中提取高纯度的总 RNA。

### 酵母细胞的用量( $2 \times 10^7$ )

酵母生长情况可以通过分光光度计进行测量。由于不同仪器的差别和各种生长条件的影响，很难给出 OD 值与酵母细胞数量之间的精确可靠的关系。例如：每毫升含  $2 \times 10^7$  个酵母细胞的培养液，稀释 4 倍后，在 Beckman DU-40 测量时，OD600 为 0.125；在 DU-7400 测量时，OD600 为 0.25。因此我们建议使用平板计数法来较准仪器测量的 OD 值。测量 OD 值时，需对样品进行稀释或浓缩，以确保读数在 0.05-0.3 的可信区间内。由于不同酵母中 RNA 含量不一致，我们推荐先用  $2 \times 10^7$  个酵母作为起始用量，根据获得的产量和纯度，再调整酵母的用量。

### 细菌的用量 ( $<1 \times 10^9$ )

细菌生长情况可以通过分光光度计进行测量。由于不同仪器之机的差别和各种生长条件的影响，我们很难给出 OD 值与细菌数量之间的精确可靠的关系。例如，每毫升含  $1 \times 10^9$  个细菌的培养液，稀释 4 倍后，在 Beckman DU-40 测量时，OD600 为 0.125；在 DU-7400 测量时，OD600 为 0.25。因此我们建议使用平板计数法来较准仪器测量的 OD 值。测量 OD 值时，需对样品进行稀释或浓缩，以确保读数在 0.05-0.3 的可信区间内。不同的培养条件以及不同细菌的 RNA 含量差别很大，我们建议在初次提取时，细菌的用量为  $2 \times 10^8$ ，然后再根据结果进行调整。

### 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GXP2，并于室温保存。
- 溶解 DNase I: 加入 650ul 的 Protease Dissolve Buffer 溶解 DNase I，颠倒混匀让 DNase I 充分溶解，溶解的 DNase I 须保存于  $-20 \sim 8^\circ\text{C}$ 。
- (可选) 2-巯基乙醇

1. 准备匀浆管：在 2ml 离心管中，加入 0.4~0.5g 混合玻璃珠和 0.5ml Buffer PHC。
2. 10,000 × g 离心 3 分钟收集 1~1.5ml 酵母或其它微生物，彻底吸弃培养液。
3. **加入 0.5ml Buffer ATL 至样品中，涡旋重悬菌体，并转移至准备好的匀浆管中。**
4. 最高速度涡旋混匀 10 分钟。
5. 65°C 温浴 10 分钟，其间颠倒混匀数次，或放置于金属浴振荡温育 10 分钟。
6. 加入 0.5ml 氯仿至样品中，涡旋混匀 15 秒。12,000 × g 离心 5 分钟。
7. **转移上清液至新的离心管中，加入 1.5 倍体积的 Buffer GXP2 至上清液中。**涡旋混匀 15 秒。
8. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至柱子中。**12,000 × g 离心 30 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。12,000 × g 离心 30 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 300µl Buffer RW1 至柱子中。**12,000 × g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。按下表配制 DNase I 反应液，轻轻混匀。把 DNase I 反应液加到 RNA 结合柱的膜中央。室温静置 20~30 分钟。

成分	用量
DNase Buffer	60µl
DNase I(20Units/µl)	10µl

12. **加入 500µl Buffer RW1 至柱子中，室温放置 10 分钟。**12,000 × g 离心 30 秒。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**12,000 × g 离心 30 秒。
14. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**12,000 × g 离心 30 秒。
15. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。12,000 × g 离心空柱 2 分钟甩干柱子的基质。

16. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。**加入 30-50 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存 -80 $^{\circ}$ C。

### 方案 3. 膜上 DNASE 消化步骤

虽然 HiPure Bacterial RNA Kits 能有效去除基因组 DNA 的污染,但对于灵敏的下游应用,如 RT-PCR, 微量的 DNA 污染都会带来很大的干扰。彻底去除 DNA 污染,可以使用 DNase I 消化来达到目的。

1. 根据样品类型,按方案 1 中步骤进行匀浆、上柱吸附 RNA。
2. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 300 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子中。**12,000  $\times$  g 离心 60 秒。
3. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。按下表配制 DNase I 反应液,轻轻混匀。把 DNase I 反应液加到 RNA 结合柱的膜中央。25-37 $^{\circ}$ C 静置 15-20 分钟。

成分	用量
DNase Buffer	60 $\mu$ l
DNase I(20Units/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l

注: DNase I 反应液须加入柱子膜中央, 不要加到壁上。

4. **加入 500 $\mu$ l Buffer RW1 至柱中,** 室温放置 10 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
5. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。**加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中,** 10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
注: 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。
6. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。**加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中,** 10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
7. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管。10,000  $\times$  g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
8. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。**加入 30-100 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子膜中央。**静置 2 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

## 常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们，我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>离心后分层现象不明显</b>	
没有加入氯仿或氯仿不纯	确保加入氯仿，氯仿不要含有异戊醇或其它添加成分。
加入氯仿后混匀效果不好	加入氯仿后，一定要用手剧烈振荡混匀 15 秒。缓慢颠倒或涡旋会导致分层不明显或杂质的污染。如果离心后分层不明显，再剧烈混匀 15 秒后离心。
样品中含有有机溶剂	若样品含有有机溶剂如 DMSO，乙醇，强碱试剂，会影响分层。
<b>RNA 产量低</b>	
细菌或酵母细胞壁去除不彻底	延长溶菌酶或破壁酶消化时间，或增加溶菌酶或破壁酶的用量。加入玻璃珠高速涡旋进一步裂解细菌或酵母。
样品起始用量太多	细菌或酵母用量不要太多
细菌或酵母培养时间过长	确保细菌或酵母的培养时间不要过长，培养液处于指数期。
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 没有加到膜上，或洗脱体积不够。再加入 30-50 $\mu$ l RNase Free Water 到膜上，室温静置 2 分钟，然后离心洗脱 RNA。
培养液没有彻底去除	从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。
Buffer RW2 没有加入乙醇稀释	使用前，Buffer RW2 必须加入无水乙醇进行稀释
70%乙醇加入体积不准确	测量上清液的体积，加入等倍体积的 70%乙醇。处理肝脏和脾脏样品时，用 50%乙醇代替 70%乙醇有利于提高产量。
<b>RNA 降解</b>	

样品用量太多 减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。

RNA 酶污染 操作过程引入 RNA 酶的污染。

### DNA 污染

没有进行 DNase I 消化 不要省略 DNase I 膜上消化步骤，确保 DNase I 消化液全部加到膜中央。

氯仿抽提振荡不够 加入氯仿后，盖紧盖子。然后用手剧烈上下振荡 15 秒。不要用涡旋或颠倒混匀。

### 下游实验结果不理想

盐分污染 加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心。

乙醇污染 确保空柱离心速度高于或等于 10,000xg，离心时间为 2 分钟。

膜材料脱落 硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。

Note: