

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
样品的匀浆及打散	5
方案 1:培养细胞小分子 RNA 抽提	7
方案 2:动物组织小分子 RNA 抽提	9
方案 3:酵母细胞小分子 RNA 抽提	10
方案 4:细菌小分子 RNA 抽提	11
方案 5:植物小分子 RNA 抽提	13
方案 6:液体样品小分子 RNA 抽提	14
方案 7:大分子 RNA 抽提	15
方案 8:总 RNA 抽提(含小分子 RNA)	16
常见问题回答	17

版本: 2010-01

简介

HiPure Universal miRNA Kit 适合于从各种生物样品中提取高纯度的小分子 RNA(smRNA(<200nt)。试剂盒结合高效的 MagZol Reagent 一步法抽提试剂和硅胶柱纯化技术，整个过程只需 50 分钟。试剂盒适合于从 $<1 \times 10^7$ 真核培养细胞， $<100\text{mg}$ 动物组织， $<100\text{mg}$ 植物组织， $<5 \times 10^7$ 酵母培养细胞和 $<1 \times 10^9$ 细菌中小分子 RNA(<200nt)。得到的小分子 RNA 可直接用于芯片分析，Northern 杂交，RT-PCR 等。该方法也可以得到大分子 RNA，或总 RNA(含小分子 RNA)，满足用户的不同要求。

原理

HiPure 硅胶柱是采用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因素吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，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。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

样品在 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苯酚，内源性或外源性的 RNASE 变性而失活，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，大分子 RNA(>200nt)被吸附上柱子的膜上，而小分子 RNA(<200nt)不被吸附。收集含小分子 RNA 的滤液，加入更多的乙醇调节小分子 RNA 的结合能力，并转移至吸附柱吸附小分子 RNA。吸附了大分子或小分子的柱子经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后被 RNASE-free Water 洗脱。

组 成

HiPure Universal miRNA Kit

产品编号	R4310-01	R4310-02	R4310-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
MagZol Reagent	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	2 x 20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	30 ml	2 x 30 ml
说明书	1	1	1

*. Buffer RWC 和 Buffer RW2 使用前需加入无水乙醇进行稀释。

保 质 期

HiPure Universal RNA Kit 除 MagZol Reagent 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 需保存于 2-8℃。因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装 RNase Free Water 并保存于-20℃，以减少污染。若 RNase Free Water 污染微生物，请重新配制。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 无 RNase 酶的枪头
- Lyticase(处理酵母样品)
- Lysozyme(处理细菌样品)
- <15,000 × g 小型离心机
- ~12,000 × g 低温离心机
- 准备合适的匀浆工具
- 用无水乙醇稀释 Buffer RWC，并于室温保存。

R4310-01	加入 10 ml 无水乙醇
R4310-02	加入 40 ml 无水乙醇
R4310-03	加入 160 ml 无水乙醇

- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。

R4310-01	加入 20 ml 无水乙醇
R4310-02	加入 80 ml 无水乙醇
R4310-03	每瓶中加入 200 ml 无水乙醇

样品的打散和匀浆

样品的打散及匀浆是所有 RNA 提取所必需的步骤。样品的打散是让组织或细胞块快速分散、细胞壁和细胞质膜破裂，从而使核酸释放到裂解液中。匀浆是指用适当的方法打断高分子量的基因组 DNA 和细胞内高分子量的物质，以降低溶液的粘稠度。打散和匀浆不充分都可能会导致 RNA 产量和纯度下降，还有可能会堵塞柱子。有些处理方法兼具打散和匀浆两种功能，如机械匀浆器；而另一些方法只起到打散的作用，如处理细胞时加入裂解液用枪吸打或涡旋，这样就还需要结合其他方法来打断基因组 DNA。下面列举了几种常见的样品打散和匀浆方法。

A:液氮处理

在处理液氮的时候，请戴上手套并小心处理；切出适量的组织，置于预冷的研钵中，迅速加入液氮，将组织研磨成粉末，然后将粉末倒入预冷的管心中。注意预先冷却离心管，否则样品倒入时，液氮沸腾而损失样品。当液氮完全挥发后，称重并加入适当的 MagZol Reagent，涡旋混匀。由于液氮研磨只能起到打散样品的作用，所以最好再用注射器或机械匀浆器匀浆，以减低裂解液的粘稠度。

B:机械匀浆器匀浆

机械匀浆器能高效匀浆大部分的组织和细胞，并同时起到打散和匀浆的作用。**把样品置于合适的 1-5ml 玻璃管或离心管中，加入裂解液，把探头插入裂解液中，高速间断匀浆，每次为 15-30 秒直至样品完全匀浆。**使用机械匀浆器时，一般组织都可以在一分钟内达到理想的匀浆效果。大部分的机械匀浆器都带有不同大小的探头，小体积的裂解液适合使用较小的探头。

C: 玻璃珠

使用玻璃珠高速震荡也能有效地裂解样品。细胞、小型生物如线虫、微量组织、酵母可用 0.4-0.6mm 酸洗玻璃珠，细菌可用 0.1-0.2mm 酸洗玻璃珠。**把样品转移至离心管中，加入 100-500 μ l 酸洗玻璃珠，再加入适量的 MagZol Reagent，高速震荡。**使用该

方法，最好采用珠磨器，如 Fastprep-24(MP), TissueLyser(Qiagen)等。珠磨效果取决于样品的大小、细胞壁厚度以及珠磨器功率，详细的操作应根据仪器进行调整。常见的涡旋仪亦可使用，但效果较差。

D: 玻璃匀浆器

玻璃匀浆器使用简单、容易获得，是常用的匀浆方法之一。它能有效处理各种软组织如肝脏、脾脏、肾、脑等。把样品和适量的裂解液转移至玻璃匀浆器中，上下推磨直至组织块被充分打散。

E: 注射器

处理培养细胞或少量动物柔软组织，如脑、胚胎等可用小型注射器(带 20#针头)进行抽打。此外，小型注射器还可以同时打断基因组 DNA 和其它高分子物质，起到降低裂解液的粘稠度的作用。注射器匀浆方式是处理细胞最常用的方法。

方案 1. 培养细胞小分子 RNA 的提取

该方案适合于从 $\leq 1 \times 10^7$ 个培养细胞样品中富集小分子 RNA(<200nt)。若不需要去除大分子 RNA(>200nt), 可按方案 8 抽提总 RNA(含大分子 RNA 和小分子 RNA)。除步骤中特别说明外, 以下离心均在室温条件下进行。

1. 收集细胞

1a. **悬浮培养细胞。**计算细胞数量。300 x g 离心 5 分钟收集细胞。小心吸弃培养液, 按第 2 步进行操作。

1b. **贴壁细胞。**贴壁细胞可在培养瓶/皿中直接裂解; 也可经胰酶消化后离心收集。

■ **直接裂解:** 计算细胞数量。彻底吸弃培养液, 按第 2 步进行操作。

■ **胰酶消化处理:** 计算细胞数量。吸弃培养液, PBS 清洗细胞, 吸弃 PBS, 再加入含 0.1-0.25%胰酶 (Trypsin) 的 PBS。当细胞从壁上脱落后, 加入含血清的培养液(血清可抑制胰酶), 并转移至离心管中, 300 x g 离心 5 分钟。彻底吸弃溶液, 并按第 2 步进行操作。

2. **加入 1 ml Magzol Reagent 至细胞样品中。**涡旋或吸打打散细胞沉淀团。

■ **离心收集的细胞:** 先弹打或涡旋使细胞松散, 加入 1 ml Magzol Reagent。用移液枪吸打 10-15 次打散细胞。

■ **贴壁细胞直接裂解:** 彻底吸弃培养液后, 向培养瓶或培养皿中加入 1 ml Magzol Reagent。用枪吹打使细胞从壁上脱落, 收集裂解液, 并转移至离心管中。

3. **室温放置 2-3 分钟让细胞充分裂解。**

此时样品可在 2-8°C 保存一周, -20°C 至-80°C 保存六个月以上。

4. **加入 200 μ l 氯仿至裂解液中。**用手剧烈振荡 15 秒, 室温静置 3 分钟。

用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿必须按比例加入, 过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中, 导致 RNA 的纯度下降。由于氯仿挥发性强, 毒性较大, 亦可用 100 μ l BCP(1-Bromo-2 chloropropane)代替。

5. **4°C, 12,000 x g 离心 15 分钟。转移 500 μ l 的上清液至新的 1.5ml 离心管中。**

按第 6-15 步进行操作富集小分子 RNA, 或按方案 8 提取总 RNA(含小分子 RNA 和大分子 RNA)。

若不需要去除大分子 RNA，按方案 8 进行操作。某些实验表明，方案 8 有利于提高小分子 RNA 产量的稳定性。初步使用该产品时，建议对两个方案进行比较，根据实验结果进行选择。

(以下离心均在室温下进行。)

6. 加入 160 μ l 无水乙醇至上清液中，涡旋混匀 10 秒。
7. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至 RNA 柱子中。**
8,000 \times g 离心 30-60 秒。
若需提取大分子 RNA，保留 RNA 柱，按方案 7 提取大分子 RNA(>200nt)。
8. **加入 600 μ l 无水乙醇至滤液中**，用移液枪吸打混匀 3~5 次。
举例：若滤液体积为 560 μ l，则需加入 504 μ l 无水乙醇。
9. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移一半体积混合液至 RNA 柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至 RNA I 柱子中。8,000 \times g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 500 μ l Buffer RWC 至 RNA 柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RWC 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书第 4 页进行稀释。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至 RNA 柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书第 4 页进行稀释。
13. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2 至 RNA 柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
14. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**13,000 \times g 离心空柱 2 分钟，以甩干柱子的基质；**这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
15. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 15~30 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。丢去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 动物组织小分子 RNA 的提取

该方案适合于从 $\leq 100\text{mg}$ 动物组织中富集小分子 RNA($<200\text{nt}$)。若不需要去除大分子 RNA($>200\text{nt}$)，可按方案 8 抽提总 RNA(含大分子 RNA 和小分子 RNA)。

1. 组织用量

组织用量是 RNA 产量和纯度的关键因素。试剂盒的组织用量可低至 0.01mg ，但最大的组织用量取决于样品中 RNA、蛋白质和杂质的含量。

- 动物脑组织、脂肪组织，RNA 含量较低，组织最大用量可至 100mg ；
- 动物肝脏、脾脏、肾脏、胸腺等，含有丰富的 RNA，组织用量不要超过 30mg ；
- 心脏、肌肉、皮肤含有中丰度的 RNA，组织用量不要超过 80mg 。

HiPure RNA Mini Column 结合能力为 $200\mu\text{g}$ 。过多的组织用量会造成大分子 RNA 的污染。如果处理的组织没有相关的信息，我们推荐第一次起始用量为 30mg ，根据获得的结果来提高或降低组织的用量。[对多数组织， 3mm 立方块的重量约为 $25\text{-}40\text{mg}$ 。]

2. **组织的裂解和匀浆：按 $10\text{-}100\text{mg}$ 的组织量，加入 1ml MagZol Reagent。**选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第 5-6 页“样品的打散及匀浆”。

3. **室温放置 2-3 分钟让组织充分裂解。**

4. (可选) 4°C ， $12,000 \times g$ 离心 10 分钟。小心转移上清液至新的离心管中。

处理脂肪样品时，离心后溶液表面会飘浮一层油脂类，小心吸弃油脂层。

5. **加入 $200\mu\text{l}$ 氯仿至裂解液或上清液中。用手剧烈振荡 15 秒；**室温静置 3 分钟。

用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿必须按比例加入，过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中，导致 RNA 的纯度下降。由于氯仿挥发性强，毒性较大，亦可用 $100\mu\text{l}$ BCP(1-Bromo-2 chloropropane)代替。

6. 4°C ， $12,000 \times g$ 离心 15 分钟。转移 $500\mu\text{l}$ 上清液至新的 1.5ml 离心管中。按方案 1 的第 6-16 步进行操作富集小分子 RNA(第 8 页)，或按方案 8 进行操作提取总 RNA(含小分子 RNA)。

若需提取同时小分子 RNA 和大分子 RNA 时，按方案 8 进行操作。某些实验表明，方案 8 有利于提高小分子 RNA 产量的稳定性。初步使用时，建议对两个方案进行比较，根据实验结果进行选择。

方案 3. 酵母小分子 RNA 的提取

该方案适合于从 2×10^6 - 5×10^7 酵母细胞中富集小分子 RNA (<200nt)。若不需要去除大分子 RNA (>200nt)，可按方案 8 抽提总 RNA (含大分子 RNA 和小分子 RNA)。

1. 酵母细胞的用量

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 2×10^7 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 2×10^7 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。

2. 4℃，1000 × g 离心 5 分钟收集酵母细胞。彻底吸弃培养液。

3. 加入 2ml 新配制的 Buffer SE 和 Lyticase（按下述方法配制），重悬细胞，于 30℃ 轻轻振荡水浴 10-30 分钟。

Buffer SE: 1M Sorbitol, 0.1M EDTA, pH7.4。使用前，加入 β-ME 至终浓度为 0.1% 和 Lyticase 至终浓度为 50U/10⁷ 个酵母细胞。

4. 4℃，1000 × g 离心 5 分钟收集酵母原生质体。彻底吸弃消化液。

5. 加入 1ml MagZol Reagent 至酵母原生质体中。剧烈涡旋 1 分钟；室温静置 5-10 分钟。

6. 加入 200 μl 氯仿至裂解液中。用手剧烈振荡 15 秒；室温静置 3 分钟；

用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿必须按比例加入，过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中，导致 RNA 的纯度下降。

7. 4℃，12,000 × g 离心 15 分钟。转移 500μl 上清液至新的 1.5ml 离心管中。按方案 1 的第 6-16 步进行操作提取小分子 RNA (第 8 页)，或按方案 8 进行操作提取总 RNA (含小分子 RNA)。

若需提取同时小分子 RNA 和大分子 RNA 时，按方案 8 进行操作。某些实验表明，方案 8 有利于提高小分子 RNA 产量的稳定性。初步使用时，建议对两个方案进行比较，根据实验结果进行选择。

方案 4. 细菌小分子 RNA 的提取

该方案适合于从 $<1 \times 10^9$ 细菌中富集小分子 RNA ($<200\text{nt}$)。若不需要去除大分子 RNA ($>200\text{nt}$)，可按方案 8 抽提总 RNA (含大分子 RNA 和小分子 RNA)。

1. 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 1×10^9 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 2×10^8 ，然后再根据结果进行调整。

- 4°C， $5,000 \times g$ 离心 5 分钟收集细菌。倒弃培养液并彻底吸弃残液
- 加入 100 μl Buffer TE/Lysozyme** (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0, 1mg/ml Lysozyme)，涡旋重悬细菌。处理葡萄球菌时，还需要加入 1 μl Lysostaphin (20mg/ml)；
- 37°C 振荡水浴 30 分钟。
- 加入 1ml MagZol Reagent 至样品中。** 剧烈涡旋 1 分钟，静置 5-10 分钟。
- 加入 200 μl 氯仿至裂解液中。** 用手剧烈振荡 15 秒，室温静置 3 分钟；
用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿必须按比例加入，过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中，导致 RNA 的纯度下降。
- 4°C， $12,000 \times g$ 离心 15 分钟。转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。按方案 1 的第 6-16 步进行操作提取小分子 RNA (第 8 页)，或按方案 8 进行操作提取总 RNA (含小分子 RNA)。
若需提取同时小分子 RNA 和大分子 RNA 时，按方案 8 进行操作。某些实验表明，方案 8 有利于提高小分子 RNA 产量的稳定性。初步使用时，建议对两个方案进行比较，根据实验结果进行选择。

方案 5. 植物小分子 RNA 的提取

该方案适合于从<100mg 植物组织中富集小分子 RNA(<200nt)。若不需要去除大分子 RNA(>200nt), 可按方案 8 抽提总 RNA(含大分子 RNA 和小分子 RNA)。

1. 组织用量

正确的组织用量是理想的 RNA 产量和纯度的保证。该试剂盒的组织用量可低至 0.01mg, 但最大的组织用量却取决于样品中 RNA 的含量, 蛋白质和杂质的含量。植物样品含有丰富的代谢物质, 我们推荐第一次起始用量为 50mg, 根据获得的结果来提高或降低组织的用量。不管何种情况, 组织用量都不能超过 100mg。

2. 用液氮将植物或真菌样品研磨成细小的粉末。转移 50-100mg 样品至 1.5ml 离心管中。**立即加入 1ml Magzol Reagent 至样品中, 涡旋混匀 30-60 秒打散样品。**
3. 室温放置 2-3 分钟让组织充分裂解;
4. 4℃, 12,000 x g 离心 5 分钟, 小心转移上清液至新的离心管中。
5. **加入 200 μ l 氯仿至裂解液中。**用手剧烈振荡 15 秒, 室温静置 3 分钟;
用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿必须按比例加入, 过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中, 导致 RNA 的纯度下降。
6. 4℃, 12,000 x g 离心 15 分钟。转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。按方案 1 的第 6-16 步进行操作提取小分子 RNA(第 8 页), 或按方案 8 进行操作提取总 RNA(含小分子 RNA)。

若需提取同时小分子 RNA 和大分子 RNA 时, 按方案 8 进行操作。某些实验表明, 方案 8 有利于提高小分子 RNA 产量的稳定性。初步使用时, 建议对两个方案进行比较, 根据实验结果进行选择。

方案 6. 血清，血浆小分子 RNA 的提取

该方案适合于从 100 μ l 血清、血浆、无细胞培养液中提取总 RNA，包括小分子 RNA。处理 100-250 μ l 血清/血浆等液体样品时，推荐使用 HiPure Liquid RNA I Kit(R4314)。处理 1ml 血清/血浆等液体样品时，推荐使用 HiPure Circulating RNA I Kit (R4316)。HiPure Circulating RNA I Kit 结合蛋白酶消化方案，可更加高效将 RNA I 从蛋白质复合体解离出来，提高 RNA I 的得率。

1. 转移 100 μ l 血浆、血清或其它无细胞液体样品至 1.5ml 离心管中。
2. **加入 1ml Magzol Reagent 至样品中**，涡旋混匀。室温放置 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；
4. 4 $^{\circ}$ C，12,000 \times g 离心 15 分钟；转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。
5. **加入等体积异丙醇**，涡旋混匀。室温静置 10 分钟。
6. 把 HiPure RNA Column I 装在 2ml 收集管中。**转移一半体积混合液至 RNA I 柱子中**。8,000 \times 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。8,000 \times g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RWC 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书第 4 页进行稀释。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书第 4 页进行稀释。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2 至柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。12,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
12. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 15~50 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央**。静置 2 分钟。12000 \times g 离心 1 分钟。丢去柱子，把 RNA I 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 7: 大分子 RNA 提取

该方案适合于从各种样品中提取大分子 RNA。

1. 取方案 1~5 的结合了大分子 RNA 柱子(HiPure RNA Mini Column)装在 2ml 收集管中。
2. **加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RWC 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书第 4 页进行稀释。
3. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书第 4 页进行稀释。
4. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2 至柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
5. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
6. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。**加入 30~100 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央**。室温静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
7. **(可选) 再加入 30~100 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央**。室温静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 30 μ l，小于 30 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 30 μ g，推荐按第 7 步进行第二次洗脱以获得更高产量。
8. 丢弃 RNA 柱子，把大分子 RNA 保存-80 $^{\circ}$ C。

方案 8: 总 RNA (含大分子和小分子)提取

该方案适合于从各种样品中直接提取总 RNA, 包括大分子 RNA 和小分子 RNA。研究表明, 在某些 RT-PCR 定量分析实验中, 该方法得到的 RNA 其 CT 值更加稳定。

1. 取方案 1~5 的上清液 (氯仿抽提后的上清液) 至新的离心管中。
2. **加入 1.5 倍体积无水乙醇至上清液。** 涡旋混匀 20 秒。
举例: 而上清液的体积为 500 μ l, 则需加入 750 μ l 无水乙醇。
3. 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。
4. 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。
5. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子上。** 8,000 \times g 离心 60 秒。
Buffer RWC 在使用之前, 必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书第 4 页进行稀释。
6. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** 8,000 \times g 离心 30 秒。
Buffer RW2 在使用之前, 必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** 8,000 \times g 离心 30 秒。
8. 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。
9. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。**加入 30~100 μ 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。
10. **(可选) 再加入 30~100 μ 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。
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 30 μ l, 小于 30 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 30 μ g, 推荐按第 10 步进行第二次洗脱以获得更高产量。
11. 丢弃 RNA 柱子, 把总 RNA(含小分子 RNA)样品保存-80 $^{\circ}$ C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，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
离心后分层现象不明显	
没有加氯仿或氯仿不纯	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，一定要剧烈振荡混匀 15 秒。颠倒或涡旋会导致分离不明显或大量的 DNA 污染。如果离心后分离不明显，重复振荡和静置，然后再离心。
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。
RNA 产量低	
样品匀浆不充分	处理培养细胞时，用注射器抽打裂解液 3-5 次进行匀浆； 处理动物组织时，推荐使用机器匀浆器匀浆；
样品起始用量太多	参照上面
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 μ l RNase Free Water 到膜上，室温静置 2 分钟，然后离心洗脱 RNA。
RNA 降解	
组织/细胞用量太多	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
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 12,000 \times g, 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 12,000 \times g 离心 2 分钟去除。