

## 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 BCP	1 ml	6 ml	30 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	200 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

版本号：2021-09-08

### 保存条件

本产品除 Magzol Reagent 和 Buffer BCP 外，其它组份可在室温保存 18 个月。Magzol Reagent 和 Buffer BCP 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( $<5 \times 10^6$  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( $1 \times 10^8$  细菌), 加入 100 $\mu$ 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 $\mu$ l 氯仿或 100 $\mu$ l Buffer BCP 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, 按简易方案进行操作或用 Buffer BCP 代替, 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(R4911)进行膜上 DNase 消化。

### 8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 600 $\mu$ 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 $\mu$ l Buffer RW2 至柱子中，12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。**
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
11. 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。**室温静置 2 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
12. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ 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  $5 \times 10^6$ ，处理复杂样品不建议这个方案。

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 $^{\circ}$ C，12,000  $\times$  g 离心 10 分钟。**转移上清至 1.5ml 离心管中，加入等体积的 Buffer RW2 至上清中，涡旋混匀 15 秒。**
3. 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  $\times$  g 离心 30~60 秒。
4. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子中，静置 2 分钟，12,000  $\times$  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。
5. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2 至柱子中，12,000  $\times$  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。
6. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2 至柱子中，12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。**
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
8. **将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 20~100 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子膜中央。**室温静置 2 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. 提取的 RNA 产量低或降解

- **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 $\mu$ 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  $\mu$ 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；