

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: 2024-01

简介

HiPure Universal miRNA Kit 适合于从各种生物样品中富集提取高纯度的小分子 RNA(smRNA(<200nt), 或含 miRNA 的总 RNA)。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	40	100	500
MagZol Reagent	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer BCP	1.8 ml	6 ml	30 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

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 x g 小型离心机
- ~12,000 x 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管中。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 and 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

处理培养细胞或小量动物柔软组织，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 1ml 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 1ml 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 氯仿或 100 μ l Buffer BCP 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 150 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。
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 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 $200\mu\text{l}$ 氯仿或 $100\mu\text{l}$ Buffer BCP 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 氯仿或 100μl Buffer BCP 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 氯仿或 100 μl Buffer BCP 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 氯仿或 100 μ l Buffer BCP 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. **加入等倍体积异丙醇**，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 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 RWVC 至柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RWVC 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. 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。
3. 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。**
4. 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。
5. 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。**
6. **(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。
7. 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**, 颠倒混匀 6-8 次。
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。