HiPure Universal RNA Mini Kit

通用型 RNA 抽提试剂盒

产 品 简 介

本产品适合于从10~100mg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。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：202401

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。
- Buffer BCP 是氯仿代替物，中文名为 1-溴-3-氯丙烷，是一种无色透明液体，不溶于水，有低毒性，为安全起见，请在通风橱或通风条件的环境中使用。

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 10~100mg 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 x g 离心收集细胞(<5 x 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 x 10^8 细菌)，加入 100μl TE/lysozyme 处理 10 分钟，然后加入 1ml MagZol Reagent，涡旋 1 分钟。
- **体液或血液样品**：转移不超过 100μl 血液、体液等样品至 1.5ml 离心管中，然后加入 1ml MagZol Reagent，涡旋 1 分钟。

2. **室温放置 5~10 分钟。**
3. **加入 100μl Buffer BCP 至裂解液中，用手上下剧烈振荡 15 秒，室温放置 3 分钟。**
4. **4°C，12,000 x 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，颠倒混匀 6-8 次。**
   若需获取 miRNA，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≤750μl 混合液至柱子中。**12,000 x 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 x g 离心 30~60 秒。**

8. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500ul Buffer RW1 至柱子。12,000 x g 离心 30~60 秒。**

   若需要彻底去除 DNA 污染，建议订购 DNase on Column Kit (R4911)进行膜上 DNase 消化。

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

10. **(可选)倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600μl Buffer RW2 至柱子中，**12,000 × g 离心 30~60 秒。

11. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000 x g 离心 2 分钟。**

12. **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。弃去柱子，把 RNA 保存于-80℃。

    当 RNA 总量高于 10μg 时, OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10μg 时，A260/230 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3μg，A260/230 会低于 0.6。这是因为 Buffer RW1 含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值，因此 A260/230 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研发表明，低浓度异硫氰酸胍不影响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下，适量提高样品用量和裂解液用量，提高核酸浓度（核酸总量>10ug)时，OD260/230 可以明显改善。

B: 快 速 方 案

本方案省略了氯仿或 BCP 抽提步骤，进行该方案操作时，动物组织用量不要超过 50mg，细胞用量不要超过 5 x 10^6，MagZol Reagent 加入量为 0.6~0.8ml，使用处理复杂样品不建议这个方案。

1. **按实验步骤 A 的第 1 步进行操作，用 0.6-0.8ml MagZol Reagent 处理生物样本。**

2. **4℃，12,000 x g 离心 10 分钟去除杂质。**

3. **转移 400μl 上清液至新的离心管中，加入 400μl Buffer RW2，颠倒混匀 6-8 次。**

4. **把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转全部混合液至柱子中。**12,000 x g 离心 30~60 秒。

5. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW1 至柱子中，**12,000 × g 离心 30~60 秒。

若需要彻底去除 DNA 污染，建议订购 DNase on Column Kit (R4911)进行膜上 DNase 消化。

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。

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 x g 离心 2 分钟。**

9. **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。弃去柱子，把 RNA 保存于-80℃。

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；
- **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 400~450μl，中间层富含 DNA。
- 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 μl 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；

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
- 减少样品用量；