

目 录

简介----- 2

原理----- 2

试剂盒组成----- 3

保质期----- 5

准备工作----- 6

样品的打散和匀浆----- 7

方案 1:细胞和动物软组织总 RNA 小量提取----- 8

方案 2:细胞和动物组织总 RNA 微量提取----- 11

方案 3:难裂解组织总 RNA 小量提取----- 14

方案 4:细胞和动物软组织总 RNA 高通量提取----- 16

方案 5:高纯度总 RNA 提取----- 19

方案 6:RNA 样品的 DNase 消化和纯化----- 21

常见问题回答----- 22

版本: 2010-01

简介

HiPure Total RNA Plus Kits 是从培养细胞、动物组织样品中提取总 RNA 最简单快速的方法。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 40 分钟。试剂盒采用 DNase 膜上消化技术，可以在提取过程中加入 DNase 至结合柱中消化去除 DNA，可以得到的无 DNA 和 DNase 污染的总 RNA，可直接用于 RT-PCR、Northern blot、polyA 纯化，核酸保护和体外翻译等实验。该系列提供 4 种规格的产品，以满足不同需求。

参数	Mini Kit	96 Kit	Micro Kit	Fibrous Kit
产品编号	R4121	R4123	R4122	R4124
细胞用量	1 × 10 ⁷	2 × 10 ⁶	1 × 10 ⁶	-
组织用量	15mg	10mg	≤10mg	20mg
样品类型	培养细胞，动物软组织(脑，肝脏，脾脏，肾脏，肺，性腺，胰腺等)			难裂解组织：皮肤，肌肉，心脏等
结合力	100μg	100μg	50μg	100μg
洗脱体积	30-100μl	75-100μl	15-50μl	30-100μl

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作用吸附核酸，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。HiPure Total RNA Plus Kits 基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液中匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。裂解液中含有的高浓度异硫氰酸胍使内源性或外源性的 RNase 变性失活，RNA 受到保护不被降解。裂解液经离心去除不溶解的杂质，加入乙醇调节结合条件后，转移至柱子中过滤，RNA 被吸附上柱子的膜上，然后将 DNase 酶消化液直接加到柱子的膜上消化降解 DNA；柱子经 Buffer RW1 洗涤去除蛋白质，DNase，降解的 DNA 和其它杂质，再经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后用 RNase Free Water 洗脱出 RNA。得到的 RNA 无 DNA 和 DNase 污染，可直接用于 RT-PCR、Northern blot、polyA 纯化，核酸保护和体外翻译等实验。

组 成

HiPure Total RNA Plus Micro Kit

产品编号	R4122-01	R4122-02	R4122-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
RTL Lysis Buffer	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
DNase I(10Units/ μ l, Roche)	120 μ l	600 μ l	5 x 600 μ l
DNase Buffer	1.8 ml	6 ml	30 ml
Carrier RNA	120 μ g	310 μ g	3 x 310 μ g
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

组 成

HiPure Total RNA 96 Plus Kit

产品编号	R4123-01	R4123-02	R4123-03
纯化次数	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
HiPure RNA Plate	1	4	20
2ml Collection Plate	1	4	20
RTL Lysis Buffer	50 ml	180 ml	1 L
Buffer RW1	100 ml	400 ml	2 x 1 L
Buffer RW2*	50 ml	200 ml	3 x 200 ml
DNase I	2 x 600 μ l	8 x 600 μ l	40 x 600 μ l
DNase Buffer	30 ml	50 ml	220 ml
RNase Free Water	30 ml	120 ml	400 ml
说明书	1	1	1

HiPure Fibrous RNA Plus Kit

产品编号	R4124-01	R4124-02	R4124-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
RTL Lysis Buffer	10 ml	30 ml	120 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	10 ml	30 ml	120 ml
DNase I	120 µl	600 µl	5 x 600 µl
DNase Buffer	1.8 ml	6 ml	30 ml
Proteinase K(RNase-Free)	6 mg	24mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure Total RNA Plus Kits 除 DNase I, Carrier RNA(R4123)和 Proteinase K(R4124)外, 其它组份可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。收到产品后, 把 DNase I 液体和 Proteinase K、Carrier RNA 干粉保存于-20℃。低温下, RTL Lysis Buffer 可能会有沉淀形成, 55℃水浴让沉淀完全溶解。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 受到污染, 请重新配制或订购。

需要准备材料和工具

- (可选)14.3M β -巯基乙醇(β -ME)或2M DTT: 使用前, 分装适量的RTL Lysis Buffer, 每1ml RTL Lysis Buffer加入20 μ l β -巯基乙醇。RTL Lysis Buffer/ β -ME混合液可室温稳定放置1个星期。 β -ME有较强的气味, 可用2 M DTT (Dithiothreitol)代替。用DEPC处理水或灭菌水配制2M DTT, 分装保存于-20 $^{\circ}$ C。按1ml RTL Lysis Buffer加入10 μ l 2M DTT, 该混合液可于室温放置2天。
- 70%乙醇: 用RNase Free Water配制
- 无水乙醇(96-100%)
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 无 RNase 酶的枪头
- 手套
- 按瓶子标签所示, 加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RVW2, 并于室温保存。
- (R4124)溶解 Proteinase K: 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉管中, 使之终浓度为: 20mg/ml。轻轻颠倒数次使 Proteinase K 充分溶解, 然后分装保存于-20 $^{\circ}$ C。举例: 若 Proteinase K 为 20mg, 则需加入 1ml Protease Dissolve Buffer。
- (R4122)溶解 Carrier RNA: 加入适量的 RNase Free Water 至 Carrier RNA 干粉中, 使之终浓度为 1 μ g/ μ l。涡旋使 Carrier RNA 充分溶解, 然后分装保存于-20 $^{\circ}$ C。Carrier RNA 反复解冻的数次不要超过 5 次。

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，还有可能引起柱子的堵塞。

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离心管中。（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。）称重并加入适量的 RTL Lysis Buffer/ β -ME，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进行匀浆，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。把样品置于合适的玻璃管或离心管中，加入裂解液，把探头插入裂解液中，高速间断匀浆，每次为 15-20 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

玻璃珠高速涡旋也能有效地裂解样品。细胞可用 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，加入适量的玻璃珠，再加入 RTL Lysis Buffer，高速涡旋 5-10 分钟。最好采用珠磨器，如 Fastprep-24(MP)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。

D: 玻璃匀浆器

玻璃匀浆器是常用的匀浆工具。能有效处理软组织如肝脏、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。由于玻璃匀浆器只能起到打散样品的作用，所以最好再用注射器匀浆几次，以减低裂解液的粘稠度。

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. 细胞和动物软组织总 RNA 提取(适用于 R4124)

该方案适合于从 $<5 \times 10^6$ 个培养细胞和 $<20\text{mg}$ 动物软组织，如肝脏、脾脏、肾脏等样品中提取高达 $100\mu\text{g}$ 总 RNA。动物皮肤、肌肉、心脏等样品含有高分子量的胶原蛋白和肌纤维，难匀浆，易堵塞柱子，需采用方案 3。以下离心条件都必须在室温下进行。

细胞用量

为得到理想的产量和纯度，细胞用量必须合理。试剂盒的细胞量可低至 1000 个细胞，但最大用量取决于样品中 RNA 的含量、柱子的结合能力和裂解液的用量。不同的细胞，其 RNA 的含量差异很大。例如：

- COS 细胞含有丰富的 RNA (1×10^6 细胞约有 $35\mu\text{g}$)。细胞用量 $\leq 2 \times 10^6$ 个。
- HeLa 细胞含有中丰度 RNA (1×10^6 细胞约有 $15\mu\text{g}$)。细胞用量 $\leq 5 \times 10^6$ 个。
- NIH/3T3 细胞含低丰度 RNA (1×10^6 细胞约有 $10\mu\text{g}$)。细胞用量 $\leq 5 \times 10^6$ 个。

若不知道细胞 RNA 含量，推荐起始用量应为 2×10^6 个细胞。再根据得到的产量和纯度，来调整下一次提取时细胞的用量。但不论何种情况，细胞用量都不要超过 5×10^6 。

细胞的收集

- ◆ **悬浮细胞：**计算细胞数量。取适量的培养液至离心管中， $400 \times g$ 离心 5 分钟收集细胞。吸弃培养液，按第 1 步进行操作。
- ◆ **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 1 步进行操作。
胰酶消化：计算细胞数量。吸弃培养液，用 PBS 清洗细胞，再加入含 0.1-0.25% 胰酶的 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， $400 \times g$ 离心 5 分钟。彻底吸弃溶液，并按第 1 步进行操作。

组织用量

正确的组织用量是获得理想 RNA 产量和纯度的保证。该试剂盒的组织用量可低至 0.1mg ，而最大的组织用量则取决于样品中 RNA 的含量、蛋白质、杂质的含量以及基因组 DNA 的含量。若处理的组织没有相关信息，推荐初次用量为 10mg ，根据获得的结果再调整组织用量。不管何种情况，组织用量都不应超过 20mg 。

- 肝脏含有大量蛋白质，组织用量 $\leq 15\text{mg}$ 。
- 脾脏、胸胰组织含大量 DNA，裂解液非常粘稠，组织用量 $\leq 10\text{mg}$ 。

控制样品量，过多的细胞或组织用量有可能会导致 DNA 消化不彻底，影响 RT-PCR 的结果！

培养细胞

1. 加入适量的 RTL Lysis Buffer/ β -ME, 打散细胞。

离心收集的细胞：弹打或涡旋松散细胞沉淀，根据细胞数量加入适量的 RTL Lysis Buffer/ β -ME。涡旋或吸打打散细胞。

- $\leq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 350 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME
- $\geq 5 \times 10^6$ 细胞：加入 600 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME

贴壁细胞：彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入适量的 RTL Lysis Buffer/ β -ME。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，并转移至离心管中。

- 6 cm 直径的培养皿：加入 350 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME
- 6-10cm 直径的培养皿：加入 600 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME

2. 匀浆(任选一种方案)，然后按第 3 步进行操作。

- 用带转头的机械匀浆器匀浆 30 秒；
- 用一次性注射器(1ml)抽打裂解液 3~5 次。

动物组织

1. 组织的裂解和匀浆：

- ≤ 10 mg 组织：使用 350 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME；
- 10-20mg 组织：使用 600 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME；

选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第 7 页的‘样品的打散及匀浆’。

2. 14,000 x g 离心 5 分钟。将上清转移至 1.5ml 离心管中。按第 3 步进行操作。

处理某些样品，如脑组织，离心后溶液表面会漂浮一层脂类。转移上清时，尽量不要吸到这一层物质(脂类物质)。脂类会造成 RNA 产量下降，还可能会引起柱子堵塞。处理脂类丰富的样品如脂肪组织等，推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。

过柱纯化

3. 加入等倍体积的 70%乙醇至裂解液中，立即用移液枪吸打 5-10 次混匀或最高速度涡旋混匀 30 秒。处理某些细胞或组织时，加入乙醇时会有沉淀析出，属于正常现象。用移液枪吸打尽量打散沉淀。不要离心去除沉淀，沉淀中含有 RNA。

操作过程中裂解液可能有损失，70%乙醇应按裂解液的实际体积加入。

4. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq 700\mu$ l 混合液(包括沉淀)至柱子中。8,000 x g 离心 30-60 秒。

5. (混合液超过 700µl) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子中。8,000 × g 离心 30-60 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 300µl Buffer RW1 至柱子上。8,000 × g 离心 1 分钟。丢失收集管和滤液。取出 RNA 柱子时，不要让柱子的底部接触到废液。
7. 把 RNA 柱装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液，轻轻混匀。

成分	用量
DNase Buffer	100 µl
DNase I(20Units/µl)	10 µl

8. 把 DNase I 反应液加到 RNA 结合柱的膜中央。25-37°C 静置 15-30 分钟。
DNase I 反应液须加入柱子膜中央，不要加到壁上。
9. 加 500µl Buffer RW1 至柱子中。静置 5 分钟。8,000 × g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中，8,000 × 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。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中，8,000 × g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。10,000 × g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
13. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30-100µl RNase Free Water 至柱子膜中央。静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
14. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

HiPure RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 30µl，小于 30µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 30µg，推荐进行第二次洗脱。HiPure Total RNA Plus Kit 只能结合大于 200nt 的总 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA，tRNA 以及其它小分子 RNA，在纯化过程中被去掉，可起到富集 mRNA 的作用。

方案 2. 细胞和动物软组织总 RNA 微量提取 (适合于 R4122)

该方案适合于从 $\leq 1 \times 10^6$ 个培养细胞和 $\leq 5\text{mg}$ 动物组织(肝脏,肾脏,脾脏等),激光切片,穿刺组织样品中提取总RNA。以下离心条件都必须在室温下进行。

Carrier RNA 的用途:

若处理小于200 μg 的动物组织或<1000个细胞时,Carrier RNA须加到RTL Lysis Buffer/ β -ME混合液中至终浓度为4ng/ μl 。Carrier RNA起着两个作用。首先,Carrier RNA能提高微量的RNA的回收效率;其次是起保护RNA的作用。按Carrier RNA:RTL Lysis Buffer/ β -ME=1:250比例混合。该混合液可在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 稳定放置2天。举例:加入4 μl Carrier RNA至1ml RTL Lysis Buffer/ β -ME中。对于一些敏感的应用,Carrier RNA可能有抑制作用,可酌情进行调整。

细胞的收集

- **悬浮培养细胞。**计算细胞数量。300 $\times$ g离心5分钟收集细胞。小心吸弃培养液,按第1步进行操作。

- **贴壁细胞。**贴壁细胞可在培养瓶/皿中直接裂解;也可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1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 $\times$ g离心5分钟。彻底吸弃溶液,并按第1步进行操作。

培养细胞

1. **加入RTL Lysis Buffer/ β -ME至细胞样品中。打散细胞。**

离心收集的细胞:先弹打或涡旋使细胞松散,然后加入适量的RTL Lysis Buffer/ β -ME。涡旋或吸打打散细胞。

- $\leq 1 \times 10^6$ 细胞:加入350 μl RTL Lysis Buffer/ β -ME
- $\leq 1 \times 10^5$ 细胞:加入75 μl RTL Lysis Buffer/ β -ME

贴壁细胞的直接裂解:彻底吸弃培养液后,往培养瓶/皿中加入适量的RTL Lysis Buffer。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。

- 6 cm直径的培养皿:加入350 μl RTL Lysis Buffer/ β -ME
- 处理 $\leq 1 \times 10^5$ 细胞的多孔板:加入75 μl RTL Lysis Buffer/ β -ME

2. **匀浆(任选一种方案):**

- 用移液枪吸打 5~10 次；
- 用一次性注射器(1ml)抽打裂解液 5 次；
- 处理<1000 细胞时，只需高速涡旋 1 分钟；

动物组织

1. **组织的裂解和匀浆：** 把样品放置于匀浆管中，加入 350 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME；选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照‘样品的打散及匀浆’。处理<2 μ g 组织时，只需高速涡旋 1 分钟；
2. 14,000 $\times$ g 离心 3 分钟。小心将上清液转移至 1.5ml 离心管中。
处理某些样品时，如脑组织等，离心后溶液表面会有脂类层，转移上清时，尽量不要吸到。脂类会造成 RNA 产量下降，还可能会引起柱子堵塞。处理脂类丰富的样品如脂肪，推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。

过柱纯化

3. **加入等倍体积 70%乙醇至裂解液中，** 涡旋混匀 30 秒。
操作过程中裂解液可能有损失，70%乙醇应按照裂解液的实际体积加入。若这一步出现明显的絮状沉淀，用移液枪吸打几次尽量打散沉淀。
4. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移混合液(包括沉淀)至柱子中。** 8,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。
5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 300 μ l Buffer RW1 至柱子上。** 8,000 $\times$ g 离心 1 分钟。丢去收集管和滤液。取出 RNA 柱子时，不要让柱子的底部接触到废液。
6. 把 RNA 柱装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液，轻轻混匀。

成分	用量
DNase Buffer	70 μ l
DNase I(10Units/ μ l, Roche)	10 μ l

7. 把 DNase I 反应液加到 RNA 结合柱的膜中央。室温静置 15 分钟。
DNase I 反应液须加入柱子膜中央，不要加到壁上。
8. **加 400 μ l Buffer RW1 至柱子中，** 静置 5 分钟。8,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。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，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。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。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。13,000 $\times$ g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
12. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 15-50 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。
13. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

HiPure RNA Mini Columns I 最小的洗脱体积是 15 μ l, 小于 15 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 10 μ g, 推荐再加入 15-50 μ l RNase Free Water 至柱子中，进行第二次洗脱。HiPure Total RNA Plus Kits 只结合大于 200nt 的总 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA, tRNA 以及其它小分子 RNA，在纯化过程中被去除，而起到富集 mRNA 的作用。

方案 3. 难裂解组织样品总 RNA 提取 (适用 R4124)

该方案采用适合于从<20mg 难裂解动物组织样品，如皮肤、肌肉、心脏等样品中提取总 RNA。以下离心均在室温下进行。

1. 样品的裂解 (任选一种方案)

- 用液氮研磨把组织块磨成粉末状，然后转移样品至离心管中。加入 350 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME，剧烈涡旋混匀。若组织粉末沾在研钵上无法转移，也可把 400 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME 加到研钵中，裂解液会因低温结冰，应对冰块进行研磨使裂解液与组织尽快混合，溶液解冻后转移至离心管中。然后按第 2 步进行操作；
- 把组织块放置于离心管中，加入 350 μ l RLT Lysis Buffer/ β -ME。用机械匀浆器高速匀浆。然后按第 2 步进行操作；
- 小型生物如线虫，寄生虫或少量的组织块等，可把样品转移至离心管中，加入 200 μ l 酸洗玻璃珠(0.4-0.6mm)和 350 μ l RTL Lysis Buffer/ β -ME，剧烈涡旋 1 分钟以打散样品。然后按第 2 步进行操作；

2. 依次加入 350 μ l RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K (20mg/ml)至裂解液。涡旋混匀。DEPC 水必须先加入以稀释溶液，否则 Proteinase K 会失活。
3. 55℃水浴 10 分钟，期间颠倒混匀 2 次。
4. 14,000 $\times$ g 离心 5 分钟。小心把上清液转移至新的离心管中。转移上清液时不要吸到沉淀。
5. 加入 0.5 倍体积的无水乙醇，立即用移液枪吸打 5-10 次混匀。处理某些样品时，加入乙醇时会有沉淀形成，属正常现象。若形成明显的大块沉淀团，用移液枪吸打尽量打散沉淀。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液(包括沉淀)至 RNA 柱子中。8,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子中。8,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 300 μ l Buffer RW1 至柱子上。8,000 $\times$ g

离心 1 分钟。丢失收集管和滤液。取出 RNA 柱子时，不要让柱子的底部接触到废液。

9. 把 RNA 柱装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液，轻轻混匀。

成分	用量
DNase Buffer	100 μ l
DNase I(20Units/ μ l)	10 μ l

10. 把 DNase I 反应液加到 RNA 结合柱的膜中央，室温静置 20-30 分钟。
注：DNase I 反应液须加入柱子膜中央，不要加到壁上。
11. **加 400 μ l Buffer RW1 至柱子中。**静置 5 分钟。8,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中，**8,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。
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。
13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中，**8,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。
14. 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。
15. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。**加入 30-100 μ l RNase Free Water 水至柱子膜中央。**静置 2 分钟。10,000 $\times$ g 离心 1 分钟。
16. **(可选)再加入 30-100 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。**静置 2 分钟。10,000 $\times$ g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。
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，推荐进行第二次洗脱。HiPure Total RNA Plus Kit 只能结合大于 200nt 的总 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA，tRNA 以及其它小分子 RNA，在纯化过程中被去掉，可起到富集 mRNA 的作用。使用试剂盒得到的 RNA 产量，因不含小分子 RNA，比起其它方法(如 Trizol)的获得的 RNA，产量会低 15-25%。

方案 4. 细胞和动物软组织总 RNA 高通量提取 (适用试剂盒: R4123)

该方案采用 96 孔 RNA 结合板, 可高通量地从 96 个 $\leq 1 \times 10^6$ 个培养细胞和 $\leq 10\text{mg}$ 动物软组织, 如肝脏、脾脏、肾脏等样品中提取高达 $50\mu\text{g}$ 总 RNA。以下离心条件都必须在室温下进行。

细胞的收集

- ◆ **悬浮细胞:** 计算细胞数量。取适量的培养液至离心管中, $300\times g$ 离心 5 分钟收集细胞。吸弃培养液, 按第 1 步进行操作。
- ◆ **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 1 步进行操作。
 胰酶消化: 计算细胞数量。吸弃培养液, 用 PBS 清洗细胞, 再加入含 0.1-0.25% 胰酶的 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, $300 \times g$ 离心 5 分钟。彻底吸弃溶液, 并按第 1 步进行操作。
 注: 培养液须彻底去除, 残留的培养液会稀释裂解液和抑制裂解, 影响 RNA 完整性和产量。

培养细胞

1. **加入适量的 RTL Lysis Buffer/ β -ME 至细胞样品中。**
 离心收集的细胞: 弹打使细胞沉淀团松散, 加入 $350\mu\text{l}$ RTL Buffer/ β -ME。涡旋或吸打打散细胞。
 直接裂解: 彻底吸弃培养液后, 向培养瓶或培养皿中加入 $350\mu\text{l}$ RTL Buffer。用枪吹打使细胞从壁上脱落, 并转移至离心管中。
2. **涡旋混匀或最高速度振荡混匀 1 分钟, 然后按第 3 步进行操作。**

动物组织

1. **组织的裂解和匀浆: 加入 $350\mu\text{l}$ RTL Buffer/ β -ME 至 10mg 组织样品中;**
 选择合适的匀浆工具进行匀浆, 详细参照第 7 页的‘样品的打散及匀浆’。
2. (可选) $5,000 \text{ rpm}$ 离心 15 分钟。转移上清液至 2ml 96 深孔板中。按第 3 步进行操作。处理某些样品, 如脑组织, 离心后溶液表面会飘浮一层脂类。转移上清时, 尽量不要吸到这一层物质(脂类物质)。脂类会造成 RNA 产量下降, 还可能会引起柱子堵塞。处理脂类丰富的样品如脂肪组织等, 推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。若样品用量较少且匀浆效果比较好的, 可以省略这一步。

过柱纯化

3. 加入等倍体积 70%乙醇至裂解液或上清液中。涡旋或振荡混匀 1 分钟。
注：操作过程中裂解液可能有损失，70%乙醇应按照裂解液的实际体积加入。
4. 把 HiPure RNA Plate 装在 2ml 收集板中。转移混合液至 RNA 结合板中。5,000 rpm 离心 5 分钟。
5. 倒弃滤液，把 RNA 结合板装在 2ml 收集板中。加入 500 μ l Buffer RW1 至结合板上。5,000 rpm 离心 5 分钟。
6. 倒弃滤液，把 RNA 结合板装在 2ml 收集板中。按下表配制 DNase I 反应液，轻轻混匀。

成分	1 个样品用量	96 个样品
DNase Buffer	140 μ l	14000 μ l
DNase I	10 μ l	1000 μ l

7. 把 100 μ l DNase I 反应液全部转移至 HiPure RNA 结合板的每一个孔的膜中央，30-37℃放置 20-30 分钟。
8. 加入 500 μ l Buffer RW1 至结合板中；静置 2 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。
9. 倒弃滤液，把结合板装在 2ml 收集板中。加入 700 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中，5,000 rpm 离心 5 分钟。
Buffer RW2 在使用之前，按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。
10. 倒弃滤液，把结合板装在 2ml 收集板中。加入 700 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中，5,000 rpm 离心 5 分钟。
11. 倒弃滤液，把结合板装在 2ml 收集板中。5,000 rpm 离心 15 分钟，以甩干柱子的基质。。
12. 把结合板装在合适的 96 板中(不提供)。加入 75-100 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。
13. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80℃。

HiPure RNA Plate 最小的洗脱体积是 75 μ l，小于 75 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量

超过 15µg, 推荐进行第二次洗脱。若需要获得最高浓度, 建议每次用 75µl 洗脱。HiPure Total RNA Plus 96 Kit 只能结合大于 200nt 的总 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%), 包括 5S RNA, tRNA 以及其它小分子 RNA, 在纯化过程中被去除, 可起到富集 mRNA 的作用。使用试剂盒得到的 RNA 产量, 因不含小分子 RNA, 比起其它方法(如 Trizol)的获得的 RNA, 产量会低 15-20%。

方案 5. 高纯度总 RNA 提取方案

适用试剂盒: R4121, R4122, R4123 和 R4124

该方案采用酸性酚氯仿抽提流程, 适合于从小于 50mg 的动物组织、植物样品、培养细胞等各种生物样品中提取高纯度的总 RNA。酸性酚氯仿可高效地去除基因组 DNA, 可去除蛋白质等杂质, 因而处理组织样品更加广泛, 处理量也更大。

需要准备的材料

- 水饱和酚
- 氯仿
- 2M NaAc, pH4.0

1. 按下列方法对样品进行匀浆:

- **动物组织:** 称取 10-50mg 动物组织到离心管中, 加入 0.5 ml RLT Lysis Buffer / β -ME, 立即用研磨杵或匀浆器进行充分匀浆。
- **贴壁细胞:** 彻底去除培养液, 对 10cm² 培养面积, 加入 0.5 ml RLT Lysis Buffer / β -ME, 移液枪吸打 3-5 次, 让细胞充分裂解;
- **悬浮细胞:** 500xg 离心收集细胞($<1 \times 10^7$ 细胞), 去除培养液。涡旋或用手指弹打松散细胞团。加入 0.5 ml RLT Lysis Buffer / β -ME, 移液枪吸打 3-5 次让细胞充分裂解;

2. 加入 0.1ml 2M NaAc, pH4.0 和 0.5 ml 水饱和酚至裂解液中。涡旋混匀。

3. 加入 0.2 ml 氯仿至裂解液中。用手剧烈振荡 15 秒。室温静置 3 分钟。

4. 4℃, 12,000 x g 离心 15 分钟。小心将上清转移至 1.5ml 离心管中。

5. 加入等倍体积的 70%乙醇至上清液中, 涡旋 30 秒混匀。

6. 把 HiPure RNA 柱装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液(包括沉淀)至柱子中。8,000 x g 离心 30-60 秒。

7. 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 x g 离心 30-60 秒

8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 300 μ l Buffer RW1 至柱子上。10,000 x

g 离心 1 分钟。丢去柱子和滤液。取出 RNA 柱子时，不要让柱子的底部接触到废液。

9. 把 RNA 柱装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液，轻轻混匀。

成分	用量
DNase Buffer	100µl
DNase I(20Units/µl)	10µl

10. 把 DNase I 反应液加到 RNA 结合柱的膜中央。25-37°C 静置 15-30 分钟。

11. **加 400µl Buffer RW1 至柱子中。**静置 2 分钟。8,000 × g 离心 30-60 秒。

12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**8,000 × g 离心 30-60 秒。

注意：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。

13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**8,000 × g 离心 30-60 秒。

14. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。10,000 × g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。

15. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。**加入 50-100µl RNase Free Water 至柱子膜中央。**静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。

16. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 30µl，小于 30µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 30µg，推荐进行第二次洗脱。HiPure Total RNA Plus Kit 只能结合大于 200nt 的总 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA，tRNA 以及其它小分子 RNA，在纯化过程中被去掉，可起到富集 mRNA 的作用。使用试剂盒得到的 RNA 产量，因不含小分子 RNA，比起其它方法(如 Trizol)的获得的 RNA，产量会低 15-25%。

方案 6. RNA 样品的 DNase 消化和纯化

适用试剂盒: R4121, R4122, R4123 和 R4124

该方案适合从各种酶促反应如标记、Dnase I 消化或 RNA 体外合成的反应液中回收 RNA; 此外还可以进一步纯化由其他方法制备的 RNA。以下离心都必须在室温下进行。

1. 把 RNA 样品(<50 μ g)转移至离心管中, 加入 10 μ l DNase Buffer 和 10 μ l DNase I, 用 DEPC 水调整总体积为 100 μ l。
2. 37°C 水浴 30 分钟消化 DNA。
3. 加入 350 μ l RTL Lysis Buffer/2-ME 至消化液中。混匀, 静置 5-10 分钟。
4. 加入 250 μ l 无水乙醇至样品中, 涡旋混匀;
若 RNA 的体积超过 100 μ l, 须相应地扩大 RTL Lysis Buffer 和无水乙醇的体积。
5. 把 HiPure RNA 小量结合柱装在 2ml 收集管中。转移混合液(<700 μ l)至柱子中。10,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。若混合液超过 700 μ l, 可分次上柱离心。
6. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释), 10,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。
注意: 在使用 Buffer RW2 之前, 必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书用无水乙醇稀释 Buffer RW2。
7. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RW2, 10,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃流出液, 把柱子套回空的收集管。10,000 $\times$ g 离心空柱 2 分钟, 以甩干柱子的基质;
9. 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。室温静置 2 分钟。室温, 10,000 $\times$ g 离心 1 分钟。如果 RNA>30 μ g, 需再加入 30-50 μ l RNase Free Water 至柱子中, 进行第二次洗脱。

常见问题回答

该列表可能有利于解决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服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学上碰到问题，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
柱子堵塞	
样品匀浆不充分	参照“样品的打散及匀浆”部分，提高样品的裂解效果；减少样品用量或增加裂解液 RTL 的用量和延长匀浆时间；
样品起始用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的先决条件；过多的组织或细胞用量反而会造成产量和纯度的下降。
裂解液加入乙醇之前没有离心	处理动物组织，加入乙醇之前需离心去除杂质。沉淀中含有细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些组织样品时，离心后裂解液表面还可能会有一层脂类层，转移上清液尽量不要吸到这些物质。
组织富含肌纤维和高分子量的蛋白等	动物组织如肌肉，心脏，皮肤，以及一些低等小型生物，因组织富含肌纤维或其它高分子量的蛋白质，会引起柱子堵塞。建议使用方案 3 进行蛋白酶消化或方案 5。
组织样品中富含脂类物质	动物组织如脑组织，脂肪富含脂类物质，加入乙醇必须离心，转移上清液时尽量不要吸到溶液表面漂浮的物质。处理脂类含量丰富的样品时，推荐使用方案 5。
低温离心	试剂盒中除特别指明，所有的离心操作都必须在室温（20-25℃）。离心条件低于 20℃时，可能会导致沉淀的形成而引起柱子堵塞。设定离心机的温度为（20-25℃）。上柱前，把裂解液和乙醇混合液放置于 37℃水浴有利于减少堵塞现象。
RNA 产量低	
样品匀浆不充分	参照上面
样品起始用量太多	参照上面
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置几分钟后，再离

	心洗脱; RNase Free WaterpH 值太低, 重新配制; 加入 RNase Free Water 太少。建议进行第二次或第三次洗脱
培养液没彻底去除	从细胞中提取 RNA 时, 要把培养液彻底吸弃。
细胞壁没彻底去除	从酵母或细菌中提取 RNA, 某些菌株可能带有很厚的细胞壁, 很难消化去除。提高酶量和延长消化时间。
70%乙醇体积不正确	测量裂解液体积, 加入等倍体积的 70%乙醇
Buffer RW2 没有加入乙醇稀释	Buffer RW2 使用前, 必须加入无水乙醇进行稀释

RNA 降解

样品用量太多	减少样品用量。正确样品用量是获得理想结果的先决条件;
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染或溶液污染
样品中 RNA 已降解	样品的不正确贮藏引起 RNA 的降解

DNA 污染

样品用量太多	减少组织用量。
样品匀浆不充分	提高匀浆效果打断高分子量基因组 DNA,降解裂解液的粘稠度。
DNase I 消化不彻底	延长 DNase I 消化时间
DNase 没有接触到膜	把 DNase 反应液加到柱子的膜中央。

下游实验结果不理想

盐类污染	加入 Buffer RW2 后, 静置 5 分钟再离心
乙醇污染	确保空柱离心时速度 12,000xg, 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。脱落的颗粒是不溶解的, 可通过 12,000xg 离心 2 分钟去除。