

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	6
准备工作	6
样品的打散和匀浆	7
方案 1:细胞/动物组织总 RNA 小量提取	8
方案 2:细胞/动物组织总 RNA 中量提取	11
方案 3:细胞/动物组织总 RNA 大量提取	14
方案 4:细胞/动物组织总 RNA 微量提取	17
方案 5:难裂解动物组织总 RNA 提取	20
方案 6:细胞/动物组织总 RNA 高通量提取	22
方案 7: DNase 膜上消化	25
常见问题回答	26

版本: 2008-01

简介

HiPure Total RNA Kits 为细胞和动物组织的总 RNA 抽提提供了简单快速的方法。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 30-60 分钟。试剂盒采用高效的 DNA 过滤技术，gDNA Filter Column 可高效地过滤去除 DNA。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。该系列产品提供 6 种规格，以满足不同的需求。

参数	Mini Kit	Midi Kit	Maxi Kit	Micro Kit	Fibrous Kit	96 Kit
产品编号	R4111	R4112	R4113	R4114	R4115	R4116
细胞用量	$\leq 1 \times 10^7$	$\leq 1 \times 10^8$	$\leq 5 \times 10^8$	$\leq 1 \times 10^6$	$\leq 1 \times 10^7$	5×10^6
组织用量	$\leq 30\text{mg}$	$\leq 200\text{mg}$	$\leq 1\text{g}$	$\leq 5\text{mg}$	$\leq 20\text{mg}$	10mg
结合力	$150\mu\text{g}$	1mg	5mg	$50\mu\text{g}$	$150\mu\text{g}$	$100\mu\text{g}$

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或 DEPC 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。DNA 过滤柱采用特殊的吸附膜，能高效选择性地过滤去除基因组 DNA。裂解液经 DNA 过滤柱处理后可高效地去除基因组 DNA，减少 RNA 产物中的 DNA 污染。

HiPure Total RNA 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 DNA 过滤柱过滤去除基因组 DNA。收集滤液加入乙醇调节结合条件后，转移至 RNA 柱子中，RNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。然后柱子经 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA 被 RNase-Free Water 洗脱。洗脱的 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。

组 成

HiPure Total RNA Mini Kit

产品编号	R4111-01	R4111-02	R4111-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Reagent DX	-	0.5 ml	1.5 ml
Buffer RL	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 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

HiPure Total RNA Midi Kit

产品编号	R4112-01	R4112-02	R4112-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Midi Columns	2	10	50
gDNA Filter Midi Columns	2	10	50
1.5 ml Collection Tubes	4	20	100
Buffer RL	1.5 ml	70 ml	350 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	60 ml
说明书	1	1	1

*: Buffer RW2 使用前，须按瓶子标签所示或加入 4 倍体积的无水乙醇进行稀释。

组 成

HiPure Total RNA Maxi Kit

产品编号	R4113-01	R4113-02	R4113-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Maxi Columns	2	10	50
gDNA Filter Maxi Columns	2	10	50
50 ml Collection Tubes	4	20	100
Buffer RL	45 ml	220 ml	1100 ml
Buffer RW1	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer RW2*	20 ml	2 x 50 ml	5 x 100 ml
RNase Free Water	10 ml	10 ml	60 ml
说明书	1	1	1

HiPure Total RNA Micro Kit

产品编号	R4114-01	R4114-02	R4114-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mico Columns	10	50	250
gDNA Filter Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	10 ml	30 ml	120 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	3 x 310 µg
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

*: Buffer RW2 使用前，须按瓶子标签所示或加入 4 倍体积的无水乙醇进行稀释。

组 成

HiPure Fibrous RNA Kit

产品编号	R4115-01	R4115-02	R4115-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	5 ml	30 ml	120 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
说明书	1	1	1

HiPure Total RNA 96 Kit

产品编号	R4116-01	R4116-02	R4116-03
纯化次数	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
HiPure RNA Plate	1	4	20
gDNA Filter Plate	1	4	20
2 ml Collection Plate	2	8	40
Buffer RL	50 ml	250 ml	2 x 550 mL
Buffer RW1	100 ml	400 ml	2 x 550 mL
Buffer RW2*	50 ml	2 x 100 ml	10 x 100 ml
RNase Free Water	30 ml	120 ml	500 ml
说明书	1	1	1

*: Buffer RW2 使用前, 须按瓶子标签所示或加入 4 倍体积的无水乙醇进行稀释。

保质期

HiPure Total RNA Kits 除 Carrier RNA 和 Proteinase K 外，其它组分可在室温下(15-25°C)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8°C。Carrier RNA 干粉和 Proteinase K 干粉以室温运输，收到试剂后应保存于-20°C。低温下，RL Buffer 可能会有沉淀形成，55°C 水浴让沉淀完全溶解。因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子(抑菌因子会影响 RT-PCR 等)，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°C，以减少污染。

需要准备材料和工具

- **14.3M β -巯基乙醇(β -ME)或2M DTT:** 使用前，分装适量的 Buffer RL，每 1ml Buffer RL 加入 20 μ l β -巯基乙醇。Buffer RL 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°C。按 1ml Buffer RL 加入 10 μ l 2M DTT，该混合液可于室温放置 2 天。(市售的 β -巯基乙醇就是 14.3M)
- 70%乙醇：用 DEPC 处理水配制
- 无水乙醇(96-100%)
- 无 RNase 酶的枪头
- 手套
- 小型离心机(14,000xg)或大型桶状离心机(5000rpm)
- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- (方案 5)溶解 Proteinase K: 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中，使其终浓度为 20mg/ml。轻轻颠倒混匀 15-30 次让 Proteinase K 充分溶解。分装保存于-20°C。
- (方案 4)溶解 Carrier RNA: 加入适量的 RNase Free Water 至 Carrier RNA 干粉中，使其终浓度为 1 μ g/ μ l。涡旋使 Carrier RNA 充分溶解。分装保存于-80°C。Carrier RNA 反复解冻的次数不要超过 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。）称重并加入适当的 RL 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 and 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 RL 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，上下推磨至组织块被充分打散。由于玻璃匀浆磨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. 细胞和动物软组织总 RNA 小量提取

适合试剂盒: R4111 和 R4115

该方案适合于从 $\leq 1 \times 10^7$ 个真核培养细胞和 $\leq 30\text{mg}$ 动物软组织,如肝脏、脾脏、肾脏,脑等样品中提取高达 $150\mu\text{g}$ 总 RNA。动物组织如肌肉,皮肤富含高分子量的肌纤维,需按方案 6(第 23 页)进行操作。以下离心均在室温下进行。

细胞用量

为得到理想的产量和纯度,细胞的用量必须合理。试剂盒的细胞用量可低至 100 个细胞,但最大的用量取决于样品中 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 的含量变化很大。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 $\leq 3 \times 10^6$ 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 $\leq 7 \times 10^6$ 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 $\leq 1 \times 10^7$ 个。

若不知道细胞 RNA 含量,推荐初次用量为 5×10^6 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 1×10^7 。

组织用量

正确的组织用量是获得理想 RNA 产量和纯度的关键。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、蛋白质和杂质的含量。

- 肝脏含有大量蛋白质,组织用量 $\leq 20\text{mg}$;
- 脾脏、胸胰组织含大量 DNA,裂解液非常粘稠,组织用量能太多 $\leq 15\text{mg}$;

若处理的组织没有相关的信息,我们推荐第一次起始用量为 15mg ,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 30mg 。

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, 300g 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 $0.1\text{-}0.25\%$ 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，而影响 RNA 完整性和产量。

培养细胞

1. 加入适量的 RL 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团，根据细胞数量加入适量的 RL Buffer/ β -ME。涡旋或吸打打散细胞。

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

直接裂解：彻底吸弃培养液后，向培养瓶或培养皿中加入适量的 RL 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 RL Buffer/ β -ME
- 6-10cm 直径的培养皿：加入 600 μ l RL 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#20 号针头的注射器抽打裂解液至少 5 次。

动物组织

1. 组织的裂解和匀浆：

- ≤ 15 mg 组织：使用 350 μ l RL Buffer/ β -ME；
- 15-30mg 组织：使用 600 μ l RL Buffer/ β -ME；

选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第 6 页的‘样品的打散及匀浆’。

2. $14,000 \times g$ 离心 5 分钟。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。处理脂类丰富样品如脂肪组织等，推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。

过柱纯化

3. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。把细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中。 $14,000 \times g$ 离心 2 分钟。

4. 丢弃 gDNA 过滤柱。加入等倍体积 70%乙醇至滤液，用移液枪吸打 5 次混匀。

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。处理肝脏和脾脏样品时，用50%乙醇代替70%乙醇可提高产量。

5. 把 HiPure RNA Micro Column 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq 700\mu\text{l}$ 混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30-60 秒。
6. (可选:混合液超过 700 μl) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。8,000 \times g 离心 30-60 秒。
7. 把柱子装在新收集管中。加入 600 μl Buffer RW1 至柱子上。8,000 \times g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中，8,000 \times 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。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。10,000 \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。
11. 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。10,000 \times g 离心 1 分钟。
12. (可选) 再加入 30-100 μl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C。

注：HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 30 μl ，小于 30 μl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 30 μg ，推荐进行第二次洗脱。HiPure Total RNA 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 2. 细胞和动物软组织总 RNA 中量提取

适合试剂盒: R4112

该方案适合于从 $\leq 1 \times 10^8$ 个真核培养细胞和 $\leq 100\text{mg}$ 动物软组织, 如肝脏、脾脏、肾脏、脑等样品中提取高达 $1000\mu\text{g}$ 总 RNA。以下离心均在室温下进行。

细胞用量

为得到理想的产量和纯度, 细胞的用量必须合理。试剂盒的细胞用量可低至 500 个细胞, 但最大的用量取决于样品中 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 的含量变化很大。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 $\leq 3 \times 10^7$ 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 $\leq 7 \times 10^7$ 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 $\leq 1 \times 10^8$ 个。

若不知道细胞 RNA 含量, 推荐初次起始用量应为 5×10^7 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 1×10^8 。

组织用量

正确的组织用量是获得理想 RNA 产量和纯度的关键。该试剂盒的组织用量可低至 1mg , 而最大的组织用量则取决于样品中 RNA 的含量、蛋白质和杂质的含量。

- 肝脏含有大量蛋白质, 组织用量 $\leq 100\text{mg}$;
- 脾脏、胸胰组织含大量 DNA, 裂解液非常粘稠, 组织用量 $\leq 100\text{mg}$;

若处理的组织没有相关的信息, 我们推荐第一次起始用量为 100mg , 根据获得的结果再调整组织用量。但不管何种情况, 组织用量都不应超过 200mg 。

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，而影响 RNA 完整性和产量。

培养细胞

1. 加入适量的 RL Buffer/ β -ME，打散细胞。

离心收集的细胞：涡旋或弹打打散细胞团，根据细胞数量加入适量的 RL Buffer/ β -ME。涡旋或吸打打散细胞。

- $\leq 5 \times 10^7$ 细胞：加入 3ml RL Buffer/ β -ME

- $\geq 5 \times 10^7$ 细胞：加入 6ml RL Buffer/ β -ME

直接裂解：彻底吸弃培养液后，向培养瓶或培养皿中加入适量的 RL 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。

- 60 cm 直径的培养皿：加入 3ml RL Buffer/ β -ME

- 60-100cm 直径的培养皿：加入 6ml RL 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#20 号针头的注射器抽打裂解液至少 5 次。

动物组织

1. 组织的裂解和匀浆：

- ≤ 100 mg 组织：使用 3ml RL Buffer/ β -ME；

- 100-200mg 组织：使用 6ml RL Buffer/ β -ME；

选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第 6 页的‘样品的打散及匀浆’。

2. 5,000 rpm 离心 10 分钟。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，还可能引起柱子堵塞。处理脂类丰富样品如脂肪组织等，推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。

过柱纯化

3. 把 gDNA Filter Midi Column 装在 1.5ml 收集管中。转移 ≤ 4 ml 细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中。5,000 rpm 离心 5 分钟。若裂解液或上清液体积超过 4ml，分次转移至柱子中并离心。

注：处理富含基因组 DNA 的样品时，gDNA 过滤柱有可能会发生堵塞。若出现

堵塞现象，建议延长离心时间至 10-15 分钟。

4. 丢弃 gDNA 过滤柱。**加入等倍体积 70%乙醇至滤液中，涡旋混匀 30 秒。**
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。处理肝脏样品时，用 50%乙醇代替 70%乙醇有利于提高产量。
5. 把 HiPure RNA Midi Column 装在 15ml 收集管中。**转移 4ml 混合液至柱子中。**
5,000 rpm 离心 5 分钟。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子。5,000 rpm 离心 5 分钟。重复这一步操作直至所有混合液都转移至柱子中，并离心。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 3 ml Buffer RW1 至柱子上。**5,000 rpm 离心 3 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 4ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**
5,000 rpm 离心 3 分钟。
注意：Buffer RW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加无水乙醇进行稀释。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 4ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**
5,000 rpm 离心 3 分钟。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。5,000 rpm 离心 15 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。
11. 将柱子转移至 15ml 离心管。**加入 300-400 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。**
室温静置 3 分钟。5,000 rpm 离心 3 分钟。
12. **(可选)再加入 300-400 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。**室温静置 3 分钟。5,000 rpm 离心 3 分钟。
13. 弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C。
注：HiPure RNA Midi Column 最小的洗脱体积是 300 μ l，小于 300 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 300 μ g，推荐进行第二次洗脱。若需要获得最高浓度，建议每次用 300 μ l 洗脱。HiPure Total RNA Midi 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 3. 细胞和动物软组织总 RNA 大量提取

适合试剂盒: R4113

该方案适合于从 $\leq 5 \times 10^8$ 个真核培养细胞和 $\leq 1\text{g}$ 动物软组织, 如肝脏、脾脏、肾脏等样品中提取高达 5 mg 总 RNA。以下离心均在室温下进行。

细胞用量

为得到理想的产量和纯度, 细胞的用量必须合理。试剂盒的细胞用量可低至 1000 个细胞, 但最大的用量取决于样品中 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 的含量变化很大。例如:

- COS 细胞含有丰富的 RNA (1×10^6 细胞约有 35 μg)。细胞用量 $\leq 2 \times 10^8$ 个;
- HeLa 细胞含有中丰度 RNA (1×10^6 细胞约有 15 μg)。细胞用量 $\leq 4 \times 10^8$ 个;
- NIH/3T3 细胞含低丰度 RNA (1×10^6 细胞约有 10 μg)。细胞用量 $\leq 5 \times 10^8$ 个。

若不知道细胞 RNA 含量, 推荐起始用量应为 3×10^8 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 5×10^8 。

组织用量

正确的组织用量是获得理想 RNA 产量和纯度的关键。该试剂盒的组织用量可低至 10mg, 而最大的组织用量则取决于样品中 RNA 的含量、蛋白质和杂质的含量。

- 肝脏含有大量蛋白质, 组织用量 $\leq 1\text{g}$;
- 脾脏、胸胰组织含大量 DNA, 裂解液非常粘稠, 组织用量能大多 $\leq 700\text{mg}$;

若处理的组织没有相关的信息, 我们推荐第一次起始用量为 700mg, 根据获得的结果再调整组织用量。但不管何种情况, 组织用量都不应超过 1500mg。

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, 300xg 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: 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 x 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, 而影响 RNA 完整性和产量。

培养细胞

1. 加入适量的 RL Buffer/ β -ME，打散细胞。

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

- $\leq 2 \times 10^8$ 细胞：加入 10ml RL Buffer/ β -ME
- $\geq 2 \times 10^8$ 细胞：加入 20ml RL 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#20 号针头的注射器抽打裂解液至少 5 次。

动物组织

1. 组织的裂解和匀浆：

- ≤ 500 mg 组织：使用 10ml RL Buffer/ β -ME；
- ≥ 500 mg 组织：使用 20ml RL Buffer/ β -ME；

选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第 6 页的‘样品的打散及匀浆’。

2. 5,000 rpm 离心 15 分钟。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，还可能引起柱子堵塞。处理脂类丰富样品如脂肪组织等，推荐使用 HiPure Universal RNA Kit。

过柱纯化

3. 把 gDNA Filter Maxi Column 装在 50ml 收集管中。把细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中。5,000 rpm 离心 5 分钟。

4. 丢弃 gDNA 过滤柱。加入等倍体积 70%乙醇至滤液中，涡旋混匀 30 秒。

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。处理肝脏样品时，用 50%乙醇代替 70%乙醇有利于提高产量。

5. 把 HiPure RNA Maxi Column 装在 50ml 收集管中。转移 20ml 混合液至 RNA 大量柱中。5,000 rpm 离心 5 分钟。

6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。5,000 rpm 离心 5 分钟。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 10ml Buffer RW1 至柱子上。**5,000 rpm 离心 5 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 15ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**5,000 rpm 离心 5 分钟。
注： Buffer RW2 在使用前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 15ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**5,000 rpm 离心 5 分钟。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。5,000 rpm 离心 15 分钟甩干柱子的基质；这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
11. 将柱子转移至新的 50ml 离心管（自备）。**加入 700-1000 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。**室温静置 3 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。
12. **(可选)再加入 700-1000 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。**室温静置 3 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。
13. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

注：HiPure RNA Maxi Column 最小的洗脱体积是 700 μ l，小于 700 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 1000 μ g，推荐进行第二次洗脱。若需要获得最高浓度，建议每次用 700 μ l 洗脱。 HiPure Total RNA Maxi 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 微量提取

适合试剂盒: R4114

该方案适合于从 $\leq 1 \times 10^6$ 个真核培养细胞和 $\leq 5\text{mg}$ 动物组织中提取总 RNA。以下离心均在室温下进行。

细胞的收集

- **悬浮培养细胞。** 计算细胞数量。300xg 离心 5 分钟收集细胞。小心吸弃培养液，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，而影响 RNA 完整性和产量。
- **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。
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，而影响 RNA 完整性和产量。
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 1 步进行操作。

Carrier RNA 的用途：

若处理 $\leq 200\mu\text{g}$ 的动物组织或 ≤ 5000 个培养细胞时，Carrier RNA 必须加到 RL Buffer/ β -ME 溶液中至终浓度为 $4\text{ng}/\mu\text{l}$ 。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，以减少内源或外源核酸酶直接作用到样品的 RNA。按 Carrier RNA:TRK Lysis Buffer/ β -ME = 1:250 比例混合。该混合液可在 2-8°C 稳定放置 2 天。举例：加入 4 μl Carrier RNA 至 1ml RL Buffer/ β -ME 中。

培养细胞

1. 加入适量的 RL Buffer/ β -ME，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 RL Buffer/ β -ME。涡旋或吸打打散细胞。

- $\leq 1 \times 10^6$ 细胞：加入 350 μl RL Buffer/ β -ME

- $\leq 1 \times 10^5$ 细胞：加入 75 μ l RL 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 RL 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 μ l RL Buffer/ β -ME
- 处理 $\leq 1 \times 10^5$ 细胞的多孔板：加入 75 μ l RL Buffer/ β -ME

2. 匀浆(任选一种方案):

- 用带转头的机械匀浆器匀浆 30 秒；
- 用一次性的#20 号针头的注射器抽打裂解液至少 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：**把样品放置于离心管中，加入 350 μ l RL 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’。

2. **14,000 \times g 离心 3 分钟。**

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。

过柱纯化

3. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。**把细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中。** 12,000 \times g 离心 1 分钟。

4. 丢弃 gDNA 过滤柱。**加入等倍体积 70%乙醇至滤液中**，用移液枪吸打 5 次混匀。
注：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。

5. 把 HiPure RNA Micro Column I 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。

6. 把柱子装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer RW1 至柱子上。** 8,000 \times g 离心 30-60 秒。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，10,000 \times g 离心 30-60 秒。

注意：Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。13,000 \times g 离心空柱 3 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。
10. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 10-50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
11. (可选) 再加入 10-50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

注：HiPure RNA Micro Column 最小的洗脱体积是 10 μ l，小于 10 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 10 μ g，推荐进行第二次洗脱。若需要获得最高浓度，建议每次用 10 μ l 洗脱。HiPure Total RNA Micro 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 15-20%。

方案 5. 难裂解组织样品总 RNA 提取

适合试剂盒: R4115

该方案采用适合于从 $\leq 20\text{mg}$ 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 500 μl Buffer RL, 剧烈涡旋混匀; 若组织粉末沾在研钵上无法转移, 也可把 500 μl Buffer RL 加到研钵中, 进行研磨使裂解液与组织尽快混合, 解冻后转移裂解液至离心管中。然后按第 2 步进行操作;
- 把组织块放置于离心管中, 加入 500 μl Buffer RL。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 μl 酸洗玻璃珠(0.4-0.6mm)和 500 μl Buffer RL, 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 250 μl DEPC 水和 20 μl Proteinase K (20mg/ml)至裂解液。颠倒混匀。55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 分钟, 其间颠倒混匀 2 次;
3. 14,000 \times g 离心 3 分钟。
4. 把 gDNA Filter Mini Column 结合柱装在 2ml 收集管中。把第 3 步得到的混合液转移至 gDNA 过滤柱中。14,000 \times g 离心 1 分钟。
5. 丢弃 gDNA 结合柱。加入 0.5 倍体积无水乙醇至滤液中, 用移液枪吸打 5 次混匀。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半的混合液至 RNA 柱中。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 μl Buffer RW1 至柱子中。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。
注意： Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
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。10,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子的基质；这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
12. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30-50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
13. (可选) 再加入 30-50 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

注：HiPure 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，推荐进行第二次洗脱。若需要获得最高浓度，建议每次用 30 μ l 洗脱。HiPure Fibrous RNA Kits 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 15-20%。

方案 6. 细胞和动物软组织总 RNA 高通量提取

适合试剂盒: R4116

该方案采用 96 孔 RNA 结合板和 96 孔 gDNA 过滤板, 可高通量地从 96 个 $\leq 5 \times 10^6$ 个真核培养细胞和小于 10mg 动物软组织, 如肝脏、脾脏、肾脏等样品中提取高达 100 μ g 总 RNA。以下离心均在室温下进行。

细胞用量

为得到理想的产量和纯度, 细胞的用量必须合理。试剂盒的细胞用量可低至 100 个细胞, 但最大的用量取决于样品中 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 的含量变化很大。例如:

- COS 细胞含有丰富的 RNA (1 $\times 10^6$ 细胞约有 35 μ g)。细胞用量 $\leq 2 \times 10^6$ 个;
- HeLa 细胞含有中丰度 RNA (1 $\times 10^6$ 细胞约有 15 μ g)。细胞用量 $\leq 4 \times 10^6$ 个;
- NIH/3T3 细胞含低丰度 RNA (1 $\times 10^6$ 细胞约有 10 μ g)。细胞用量 $\leq 5 \times 10^7$ 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 1×10^7 。

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、蛋白质和杂质的含量。

- 肝脏含有大量蛋白质, 组织用量 ≤ 15 mg;
- 脾脏、胸胰组织含大量 DNA, 裂解液非常粘稠, 组织用量能大多 ≤ 10 mg;

若处理的组织没有相关的信息, 我们推荐第一次起始用量为 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。

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, 300xg 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 × 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，而影响 RNA 完整性和产量。

培养细胞

1. 加入适量的 RL 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团，加入 350μl RL 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 350μl RL Buffer。用枪吹打使细胞从壁上脱落。

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 350μl RL Buffer/β-ME 至 10-15mg 组织样品中；选择合适的匀浆工具进行匀浆，详细参照第 6 页的‘样品的打散及匀浆’。

2. (可选)5,000 rpm 离心 5 分钟。按第 3 步进行操作。

过柱纯化

3. 把 gDNA Filter Plate 装在 2ml 收集板中。把细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中。5,000 rpm 离心 5 分钟。

4. 丢弃 gDNA 过滤板。加入等倍体积 70%乙醇至滤液中，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。处理肝脏样品时，用 50%乙醇代替 70%乙醇有利于提高产量。设定振荡速度：在一个空的 2ml 96 孔板中，加入 700μl 灭菌水，然后转移至 96 孔涡旋仪上，设定最大涡旋速度但又不会让灭菌水溢出孔口。推荐使用 MS3 Vortex (IKA)。

5. 把 HiPure RNA Plate 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。

6. 把 HiPure RNA 结合板装在 2ml 收集板中。加入 700μl Buffer RW1 至结合板上。5,000 rpm 离心 5 分钟。

7. 把 HiPure RNA 结合板装在 2ml 收集板中。加入 700μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)

至结合板中，5,000 rpm 离心 5 分钟。

注意： Buffer RW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。

8. 把 RNA 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。
9. 把 RNA 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；这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
10. 把 RNA 结合板装在合适的收集板(自备)中。加入 75 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。
11. 再加入 75 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。
12. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

注：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 15 μ g，推荐进行第二次洗脱。若需要获得最高浓度，建议每次用 75 μ l 洗脱。 HiPure Total RNA 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 15-20%。

方案 7. 膜上 DNase 消化处理

虽然 HiPure Total RNA Kits 能有效去除基因组 DNA，但对于灵敏的下游应用，如 RT-PCR，微量的 DNA 残留都会带来干扰。HiPure Total RNA Kit 提供了一种快速简单的膜上 DNase 消化方法，可在提取流程中插入 DNase I 的消化步骤，消化结束后，又可将 DNase I 洗涤去除。

1. 根据样品类型，按方案 1-6 中方法进行匀浆、上柱吸附 RNA 以及第一次 Buffer RW1 洗涤步骤操作。
2. 倒弃流出液，把柱子装在回收管中。按下表配制 DNase I 反应液，轻轻混匀。

成分	微量	小量	中量	大量	96 孔板
Digestion Buffer	37 μ l	65 μ l	400 μ l	800 μ l	90 μ l
DNase I	3 μ l	10 μ l	30 μ l	50 μ l	10 μ l

3. 把 DNase I 反应液全部转移至 HiPure RNA 结合柱子的膜中央，室温静置(25-30°C)静置 15-30 分钟；
4. 按下表，加入适量体积的 Buffer RW1 至柱子中，静置 5 分钟。按标准方案的离心速度和时间进行离心。

成分	微量	小量	中量	大量	96 孔板
Buffer RW1	500 μ l	500 μ l	1ml	10ml	500 μ l

5. 倒弃流出液，把柱子装在回收管中。按标准方案的流程用 Buffer RW2 进行洗涤，空甩干燥和洗脱。简单描述为：
 - 5.1 用适量的 Buffer RW2 洗涤柱子两次。
 - 5.2 空甩干燥柱子，去除乙醇。
 - 5.3 用适量的 RNase Free Water 脱出 RNA。
 - 5.4 丢去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

8. 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。此外，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； 提高离心速度和时间； 减少样品用量或增加 RL Buffer 的用量；
样品起始用量太多	减少样品用量。过多的组织/细胞用量会造成产量和纯度的下降。
裂解液离心不充分	处理动物组织，裂解液需离心去除杂质。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 5，进行蛋白酶消化。
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。处理富含脂类的物质，推荐使有 HiPure Universal RNA Kit。
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℃）。
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 Water pH 值太低，重新配制；
加入 RNase Free Water 太少。需进行第二步洗脱

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。

RNA 降解

样品用量太多
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；

RNA 酶污染
操作过程引入 RNA 酶的污染或溶液都污染

样品中 RNA 已降解
样品的不正确贮藏引起 RNA 的降解，推荐使用 RNASafer Reagent 来保存样品。

DNA 污染

进行 DNase I 消化
请另外订购 DNASE I，进行膜上消化步骤以彻底去除 DNA 污染

样品用量过多
过组织用量超过 gDNA 柱子的结合能力，减少组织用量

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 $\leq 12,000xg$ ，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。

Note: