

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	5
准备工作	6
方案 1:常规真菌组织总 RNA 小量抽提	7
方案 2:难提抽真菌组织总 RNA 小量抽提	9
常见问题回答	10

版本: 2008-01

简介

真菌和植物样品含有大量的代谢物质，如多酚类物质、多糖类物质以及其它次生代谢物质。这些代谢物质常常会干扰到 RNA 的提取和下游的应用。HiPure Fungal RNA Kits 采用硅胶柱纯化技术和特殊的溶液系统，适合于从各种真菌或植物样品中抽提高纯度的总 RNA。该方法得到的 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。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 20-60 分钟。

原理

HiPure 硅胶柱以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化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，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。DNA 过滤柱采用特殊的吸附膜，能高效选择性地吸附基因组 DNA，而不吸附 RNA。DNA 过滤柱可高效地去除基因组 DNA，减少的 DNA 污染。

HiPure Fungal RNA Kits 基于硅胶柱纯化方式。真菌样品在含高浓度异胍盐裂解液中匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。由于裂解液中含有变性剂，内源性或外源性的 RNASE 变性而失活，RNA 被保护起来。裂解液经离心去除不溶解的杂质，得到的上清液经 gDNA 过滤柱过滤去除基因组 DNA，得到的滤液加入乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，RNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质和杂质则不被吸附而去除。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。

组 成

HiPure Fungal RNA Mini Kit

产品编号	R4155-01	R4155-02	R4155-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
MagZol Reagent	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer PRC1	10 ml	40 ml	200 ml
Buffer PRC2	10 ml	40 ml	200 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

*: Buffer RW2 使用前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇稀释。

保 质 期

HiPure Fungal RNA Kits，除 MagZol Reagent 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。MagZol Reagent 需置于 2-8℃。低温下保存， Buffer PRC1 或 Buffer PRC2 可能会有沉淀形成，55℃水浴让沉淀完全溶解后使用。

需要准备材料和工具

- **β-巯基乙醇(14.3M, β-ME):** 一般市售的β-巯基乙醇都是14.3M。β-ME是RNase强烈变性剂,需要添加至PRC1,以提高裂解液变性和抑制RNASE的能力。使用前,分装适量的PRC1,按每1ml PRC1 Buffer加入20μl β-巯基乙醇。Buffer PRC1 Buffer/β-ME混合液可室温稳定放置1个星期。β-ME气味难闻,毒性较强,可用2 M DTT (Dithiothreitol)来代替β-ME。用RNase Free Water或灭菌水配制2M DTT,然后分装保存于-20℃。按1ml PRC1 Buffer加入10μl 2M DTT. 该混合液可室温放置2天。
- 无水乙醇(96-100%)
- (常规方案)氯仿
- 合适大小的无 RNase 酶的离心管
- 无 RNase 酶的枪头
- 手套
- 研钵与研磨棒
- 液氮
- 水浴锅
- 按瓶子标签指示,加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RW2,并于室温保存。

方案 1. 常规真菌样品总 RNA 小量抽提

该方案适合于从 50~150mg 次生代谢物质较少的真菌/植物样品中提取高纯度的总 RNA。富含多糖类真菌样品推荐使用方案 2。

1. 真菌样品的研磨。

- 收集样品并尽快浸泡到液氮中以防止 RNA 的降解。使用研钵、研磨棒和液氮将植物样品研磨成尽量细小的粉末。RNA 的产量取决于样品类型和研磨效果。研磨后的样品可直接保持于-70°C。
- 快速称取 50-150mg 的研磨好的样品至 1.5ml 预冷的离心管中。在加入裂解液之前，不要让样品解冻。初次使用时，推荐先使用 50mg，待取得理想结果后，再酌情提高用量。

2. **立即加入 1ml MagZol Reagent 至样品中。**涡旋 30~60 秒充分打散样品，室温静置 3~5 分钟让样品充分裂解。

3. **加入 0.2ml 氯仿至样品中。**用手剧烈振荡混匀 15 秒。冰上放置 10 分钟。

4. 4°C, 12,000 × g 离心 15 分钟。

5. **小心转移 0.5ml 上清液至新的离心管中，加入 0.25ml 无水乙醇至上清中。**涡旋混匀 20 秒。

以下离心均在室温下进行。

6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移第 5 步的混合液至 RNA 柱子中。**10,000 × g 离心 30~60 秒。

7. (可选)这一步可插入 DNase 进行膜上消化。(请另外订购 DNase On Column Kit 进化膜上 DNase 消化)。

8. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。**加入 500µl Buffer RW1 至柱子中。**10,000 × g 离心 30~60 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 × g 离心 30~60 秒。

在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。

10. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子套回空的收集管。10,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
12. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 30-50 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。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 至柱子的膜中央。**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。如果 RNA 产量超过 30 μ g，推荐按第 13 步进行第二次洗脱。
14. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 难提取真菌样品总 RNA 小量抽提

该方案适合于从 $\leq 100\text{mg}$ 各种真菌样品或植物样品，包括多糖类和多酚类的植物样品中抽提高纯度的总 RNA。

1. 真菌或植物样品的研磨

- 收集样品并尽快浸泡到液氮中以防止 RNA 的降解。使用研钵、研磨棒和液氮将植物样品研磨成尽量细小的粉末。RNA 的产量取决于样品类型和研磨效果。研磨后的粉末可直接保持于 -70°C 。
- 快速称取 50~100mg 的研磨好的样品至 1.5ml 预冷的离心管中。
在加入裂解液之前，不要让样品解冻。初次使用时，推荐先使用 50mg，待取得理想结果后，再酌情提高用量。

2. 立即加入 700 μl Buffer PRC1/ β -ME 混合液至样品中。立即于最高速度涡旋 30-60 秒充分打散样品。55 $^{\circ}\text{C}$ 短暂水浴 3 分钟。

使用前，分装适量的 Buffer PRC1，每 1ml Buffer PRC1 加入 20 μl β -巯基乙醇或 2M DTT。处理某些样品时，如桉树叶片等，加入 PVP-40 固体至 Buffer PRC1(终浓度为 2%)，溶解后再按此步操作有利于提高产量。

3. 14,000 \times g 离心 5 分钟。

4. 把 gDNA 过滤柱装在 2ml 收集管中。把第三步的上清液转移至 gDNA 过滤柱中。14,000 \times g 离心 2 分钟。

5. 弃去 gDNA 过滤柱。加入等倍体积 Buffer PRC2 至滤液中。用移液枪吸打 3-5 次混匀。

6. 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。10,000 \times g 离心 30-60 秒。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。把剩余的混合液转移至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。

8. (可选)这一步可插入 DNase 进行膜上消化。(请另外订购 DNase On Column Kit 进行膜上 DNase 消化)。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW1 至柱子上。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
10. 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。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。
11. 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。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
12. 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。
13. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 30~50 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
14. **(可选)再加入 30~50 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
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。如果 RNA 产量超过 30 μ g，推荐按第 14 步进行第二次洗脱。
15. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员可随时为您提供咨询服务。若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，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，初次使用时，推荐只用一半的样品，然后根据结果调整样品的用量。
样品富含多糖类	样品富含多糖类物质，导致裂解液变得非常粘稠，减少样品的用量或加入裂解液的用量。
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°C）。离心条件低于 20°C 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°C）。
RNA 产量低	
样品不充分匀浆	加入裂解液 MagZol Reagent 或 Buffer PRC1 后，要立即涡旋充分打散样品。
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必要条件。
洗脱效率低	洗脱时，RNase Free Water 体积太少或没有加到膜上。增加洗脱液的体积或增加洗脱次数
Buffer RW2 没有加入乙醇稀释	使用前，Buffer RW2 须加入 4 倍体积的无水乙醇稀释，或按瓶子标签指示进行稀释。
无水乙醇或 Buffer PRC2 加入的体积不对	在过 RNA 柱子前，须加入 0.5 倍体积的无水乙醇或等体积 Buffer PRC2 至滤液中，混匀后，再过 RNA 柱。
RNA 降解	
操作不规范	液氮研磨后，在加入裂解液之前，不要让样品解冻

样品用量太多 减少样品用量。

RNA 酶污染 操作过程可能引入 RNA 酶的污染

DNA 污染

样品用量太多 样品用量太多，超过 gDNA 柱的结合能力。

膜上 DNase 消化

该产品携带的 gDNA 柱可高效地去除基因组 DNA。但对灵敏的 RT-PCR 应用，推荐另订购 DNase Column Kit 进行膜上 DNase 消化，以彻底去除基因组 DNA 的污染。

下游实验结果不理想

盐分污染 加入 Buffer RW2 后，静置 3 分钟后，再离心，

乙醇污染 确保按照说明书中的条件空甩柱子

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 × g 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。

