

HP 总 RNA 提取试剂盒

E.Z.N.A.[®] HP Total RNA Kit

货号	R6812-00	R6812-01	R6812-02
反应次数	5 次	50 次	200 次
HiBind [®] RNA Mini Columns	5 个	50 个	200 个
gDNA Removal Columns	5 个	50 个	200 个
2 mL Collection Tubes	10 个	100 个	400 个
GTC Lysis Buffer	5 mL	40 mL	150 mL
RNA Wash Buffer I	5 mL	50 mL	200 mL
RNA Wash Buffer II	2 mL	12 mL	50 mL
Nuclease-free Water	5 mL	10 mL	40 mL
User Manual	✓	✓	✓

★ 保存方式及稳定性

1. 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输；
2. 当贮存温度较低时，GTC Lysis Buffer 易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37°C 中至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用；
3. 本试剂盒仅供科学研究使用。

★ 实验前准备

1. 按照下表提示，使用【无水乙醇】对 RNA Wash Buffer II 进行稀释，稀释后室温保存；

货号	无水乙醇 加入量
R6812-00	8 mL
R6812-01	48 mL
R6812-02	200 mL

2. (可选) 每毫升 GTC Lysis Buffer 需加入 20 μ L 2-巯基乙醇，该混合液可室温贮存两周。

★ 组织样品的均质化技术

有效地匀浆均一化组织对于成功提取总 RNA 至关重要。破坏样品细胞壁和原生质体是把 RNA 从样品中释放出来必要的一步，而均质化是为了降低裂解物的粘度。均质化把基因组 DNA 以及其它高分子细胞成分进行破碎，形成均质裂解液。不完全均质化会使 HiBind® RNA Mini Columns 堵柱，从而导致产量低或无产量。

定转子均质仪：样品裂解和均质化

使用定转子均质仪对样品进行裂解和均质化，可以处理大多数的样品。这个过程通常需要时间少于 1min，具体根据不同的样品类型决定。许多均质仪使用不同大小的马达和匀浆探头，大部分都可以在 50mL 离心管中操作。

珠磨仪：样品裂解和均质化

使用珠磨仪，细胞和组织样品可以在研磨珠和裂解液中快速搅拌进行裂解和均质化。用于酵母/单细胞 RNA 提取最佳的研磨珠大小为 0.5mm，组织样本的为 3-6mm。

★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 离心转速可达 14,000xg 的小型离心机
- ✓ 涡旋仪
- ✓ 无酶吸头及 1.5mL 离心管
- ✓ 无水乙醇、70%乙醇（由无酶水配置）、2-巯基乙醇
- ✓ 匀浆工具（玻璃珠、自动匀浆仪等）
- ✓ （可选）真空抽滤装置、DNase I 消化套装（货号 E1091）

★ 提取步骤 —— 细胞样品

1. 使用正确数量的培养细胞对获得最佳提取效果至关重要。HiBind® RNA Mini Columns 的最大结合能力为 100µg。GTC Lysis Buffer 可有效裂解的最大细胞数为 1×10^7 。如首次进行实验，我们建议从 1×10^6 个细胞开始尝试提取，待获得理想产量后，可在下一次提取中适当增加样品量。
2. 按照如下方法收集不超过 1×10^7 数量的细胞：

- ✓ 悬浮培养细胞：
 1. 500xg 离心 5min 收集细胞，弃去上清培养液；
 2. 接第 3 页第 3 步继续操作。
- ✓ 贴壁培养细胞：

注意：贴壁培养可以选择在培养皿中直接裂解，也可选择用胰蛋白酶消化后作细胞沉淀收集。在培养瓶中生长的细胞，我们建议使用胰蛋白酶进行消化。

1) 直接裂解操作办法：

1. 弃除培养基；
2. 接第 3 页第 3 步继续操作。

2) 胰蛋白酶消化及细胞收集操作办法：

1. 弃除培养基并使用 PBS 溶液对细胞进行洗涤；若培养基清洗不彻底，可能会抑制胰蛋白酶活性；
2. 盐溶液中加入 0.1-0.25%的胰蛋白酶，室温孵育 3-5 分钟让细胞分散；
3. 加入等体积含有血清的细胞培养基使胰蛋白酶失活，转移到无酶的离心管内；
4. 室温，500xg 离心 5min，去除上清培养基
5. 接第 3 页第 3 步继续操作。

3. 使用 GTC Lysis Buffer 裂解细胞，涡旋或上下吸打彻底混匀；

注意：按照“实验前准备”每毫升 GTC Lysis Buffer 需加入 20 μ L 2-巯基乙醇。

细胞数量	GTC Lysis Buffer 加入体积
< 5x10 ⁶	350 μ L
5x10 ⁶ -1x10 ⁷	700 μ L
培养皿直径 (cm)	GTC Lysis Buffer 加入体积
< 6	350 μ L
6-10	700 μ L

4. 将 gDNA Removal Column 套入 2mL 离心管中，将裂解液转移至 gDNA Removal Columns 中，室温 13,000xg 离心 1min 去除不溶解的杂质，收集滤液；
5. 加入与滤液等体积的 70%乙醇（使用无酶水配制），涡旋彻底混匀，请勿进行

离心或瞬时离心；

注意：加乙醇后可能会有沉淀析出，需打散沉淀后再过柱。

6. 将 HiBind® RNA Mini Column 套入收集管中，转移第 5 步得到的混合液到结合柱中（每次转移的混合液 $\leq 700\mu\text{L}$ ），室温 10,000xg 离心 1min，弃滤液；
7. 重复步骤 6，直至所有混合液都结合到 HiBind® RNA Mini Column 上；

可选 DNase I 消化步骤（需另购 DNase I Set 货号 E1091）

如需使用 DNase I 对 DNA 污染进行消解，请参考第 6 页“DNase I 消化步骤”。

如无需进行 DNA 消解，请接着按第 8 步操作；

8. 将 HiBind® RNA Mini Column 套入收集管中，加入 500 μL RNA Wash Buffer I 至结合柱中，10,000xg 离心 30s，弃滤液；
 9. 将 HiBind® RNA Mini Column 套回收集管中，加入 500 μL RNA Wash Buffer II（已加无水乙醇正确稀释）至结合柱中，10,000xg 离心 1min，弃滤液；
- # 注意：**RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。
10. 重复步骤 9 进行第二次 RNA Wash Buffer II 洗涤；
 11. 将 HiBind® RNA Mini Column 套回收集管中，10,000xg 离心空甩 2min。
 12. 将 HiBind® RNA Mini Column 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 30-70 μL Nuclease-free Water 至结合柱中，10,000xg 离心 2min 洗脱 RNA，产物放置 -70°C 保存。

注意：以下操作可能帮助提高 RNA 产量：

- 使用前将 Nuclease-free Water 70°C 预热；
- 室温静置 5min；
- 增加洗脱液的体积；
- 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）
- 将第一次洗脱出的 Nuclease-free Water 重新加回到柱子中进行二次洗脱（可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积）

★ 提取步骤 —— 动物组织样品

1. 使用正确组织起始量对获得最佳提取效果至关重要。HiBind® RNA Mini Columns 的最大结合能力为 100µg。GTC Lysis Buffer 可有效裂解的最大组织量为 30mg。如首次进行实验，我们建议从 10mg 样品量开始尝试提取，如获得理想产量后，可在下一次提取中适当增加样品量；
2. 参考以下组织量加入 GTC Lysis Buffer 并参考第 2 页“组织样品的均质化技术”其中一种裂解方式进行匀浆；

组织量	GTC Lysis Buffer 加入体积
≤ 15 mg	350 µL
20-30 mg	700 µL

注意：如样品贮存在 RNALater® 请使用 700 µL GTC Lysis Buffer。

3. 最大速度(> 13,000xg)离心 5min 去除不溶解的杂质；
4. 将 gDNA Removal Columns 套入 2mL 离心管中，再将步骤 3 的上清转移至 Column 中，室温 13,000xg 离心 1min，收集滤液。
注意：确保所有液体都已经通过 gDNA Removal Columns，如果有必要，可以重复离心直至所有的液体都已经通过。
5. 将滤液转移到 1.5 mL 离心管，加入与滤液等体积的 70%乙醇，涡旋彻底混匀，请勿进行离心或瞬时离心；
6. 按照第 4 页“细胞提取方案”的步骤 6-12 进行操作。

★ 提取步骤 —— 真空抽滤方案

1. 按照第 2-4 页“细胞提取方案”的步骤 1-5 准备好细胞样品裂解结合液；或按照第 5 页“组织提取方案”的步骤 1-5 准备好组织样品裂解结合液；注意使用抽滤方案时，请勿加入超过 1×10^6 的细胞或 10mg 组织量。
2. 按照说明书将 HiBind® RNA Mini Columns 与真空抽滤装置连接。转移裂解结合液到结合柱中，打开真空泵，使所有混合液通过柱子，关闭真空泵。

可选 DNase I 消化步骤 (需另购 DNase I Set 货号 E1091)

如需使用 DNase I 对 DNA 污染进行消解，请参考第 7 页“DNase I 消化步骤”。如无需进行 DNA 消解，请接着按第 3 步操作；

3. 加入 500 μ L RNA Wash Buffer I 至结合柱中，打开真空泵，使所有混合液通过柱子，关闭真空泵；
4. 加入 500 μ L RNA Wash Buffer II（已加无水乙醇正确稀释）至结合柱中，打开真空泵，使所有混合液通过柱子，关闭真空泵；
注意：RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。
5. 重复步骤 4 进行第二次 RNA Wash Buffer II 洗涤；
6. 将 HiBind[®] RNA Mini Columns 从真空抽滤装置中取下，套回 2mL 收集管中，13,000xg 离心空甩 2min。
7. 将 HiBind[®] RNA Mini Columns 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 30-70 μ L Nuclease-free Water 至结合柱中，室温放置 2 min，10,000xg 离心 1min 洗脱 RNA，产物放置-70 $^{\circ}$ C 保存。
注意：以下操作可能帮助提高 RNA 产量：
 - 使用前将 Nuclease-free Water 70 $^{\circ}$ C 预热；
 - 室温静置 5min；
 - 增加洗脱液的体积；
 - 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）
 - 将第一次洗脱出的 Nuclease-free Water 重新加回到柱子中进行二次洗脱（可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积）

★ DNase I 消化步骤（可选步骤）

用户自备试剂：DNase I Digestion Set (货号 E1091)

按照上述《细胞提取方案》、《组织提取方案》完成 1-7 步或按照《真空抽滤方案》完成 1-2 步后，请按以下步骤操作：

1. 每一个 HiBind[®] RNA Mini 结合柱，按照按下表配置 DNase I 溶液：

溶液名称	每份配量
Digestion Buffer	73.5 μ L
RNase-Free DNase I	1.5 μ L
总量	75 μ L

重要提示：

- ✓ DNase I 非常敏感且易发生物理变性，切勿大力涡旋 DNase I 溶液。建议轻柔颠倒离心管进行混匀；
- ✓ DNase I 混合液需现配现用；
- ✓ 请使用套装内配套的 Digestion Buffer 消化液，其他消化液与膜上消化操作不配套，可能会降低 RNA 产量及纯度；
- ✓ 全部操作均在室温下进行，请谨慎且尽量快速地操作。

2. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套入 2ml 收集管中，往 HiBind® RNA Mini Columns 加入 250 μ L RNA Wash Buffer I，10,000 \times g 室温离心 1min，弃掉滤液；
3. 将配置好的 75 μ L 的 DNase I 溶液，转移至 HiBind® RNA Mini Columns 膜的正中央，切勿打到结合柱壁；
4. 室温静置 15min；
5. 加入 250 μ L RNA Wash Buffer I 至 HiBind® RNA Mini Columns 中，室温静置 2min，10,000 \times g 离心 1min，弃滤液；
6. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套回收集管中，加入 500 μ L RNA Wash Buffer II（已加无水乙醇稀释）至结合柱中，10,000 \times g 离心 1min，弃滤液；
注意：RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。
7. 重复步骤 6 进行第二次 RNA Wash Buffer II 洗涤；
8. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套回收集管中，10,000 \times g 离心空甩 2min。
9. 将 HiBind® RNA Mini Columns 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 30-70 μ L Nuclease-free Water 至结合柱中，10,000 \times g 离心 2min 洗脱 RNA，产物放置 -70°C 保存。

注意：以下操作可能帮助提高 RNA 产量：

- 使用前将 Nuclease-free Water 70°C 预热；
- 室温静置 5min；
- 增加洗脱液的体积；
- 用新的 Nuclease-free Water 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）

★ 产品信息卡



更多详情，请扫描左方二维码获取原文说明书

中文翻译仅供辅助阅读



常见问题合集及操作注意事项

请扫描左方二维码获取



中国总代理：广州飞扬生物工程有限公司

技术支持：020-32051125

企业 QQ：800848200 (人工客服在线)

中文网站：omegabiotek.com.cn

如需查询代理商名录，请关注“飞扬生物”微信号获取

售后保障服务说明

为确保您所使用的试剂为正品来源，请从使用单位所在地指定代理商处购买 Omega bio-tek 产品。由其他渠道购买或任一标签信息(应包括货号、条形码、完整 Lot 号、失效日期)缺失的试剂盒，我司恕不提供任何质量保证及售后服务。