

## 目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1:生物膜 RNA 抽提	5
方案 2:DNase 膜上消化	7
常见问题回答	8

版本: 2024-01

## 简介

HiPure BioFilm RNA Kit 适合于从生物膜样品中提取高纯度总 RNA。在自然界中，细菌和真菌等微生物会粘附在物质(岩石，支持物)的表面，形成生物膜。这些生物膜包括复杂的微生物种群，形成了极小的生态系统。生物膜样品中含富多糖类物质或色素，是 RNA 提取的难点。试剂盒结合高效珠磨法和热酚法处理技术，可高效地从各种生物膜样品中提取高纯度的 RNA。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。

## 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。

HiPure BioFilm RNA Kit 适合于从生物膜中提取微生物总 RNA。生物膜经液氮研磨，加入裂解液和热酚进一步裂解微生物。RNA 释放到裂解液中。加入氯仿抽提去除 DNA 和蛋白质，转移上清液并用乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，RNA 被吸附在柱子的膜上，而杂质不被吸附而去除。柱子经 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后用 **RNase Free Water** 洗脱出 RNA。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。

## 组 成

### HiPure BioFilm RNA Kit

产品编号	R4187-01	R4187-02	R4187-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
2ml Beads Tubes	10	50	250
Buffer SPL	12 ml	30 ml	150 ml
Buffer PHC	12 ml	30 ml	150 ml
Buffer RSL3	12 ml	60 ml	270 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	20 ml	60 ml
说明书	1	1	1

\*: Buffer RW2 使用前，需按瓶子标签的指示加入 4 倍体积的无水乙醇进行稀释。

## 保质期

HiPure BioFilm RNA Kit 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。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°C，以减少污染。

## 需要准备材料和工具

- ℳ 无水乙醇(96-100%)
- ℳ 氯仿
- ℳ 水饱和酚
- ℳ (可选：膜上 DNASE 处理) DNase On Column Kit
- ℳ 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- ℳ 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- ℳ 无 RNase 酶的枪头
- ℳ 小型离心机

## 方案 1. 生物膜总 RNA 提取

该方案适合于从 50-100mg 生物膜中提取总 RNA。

1. 用液氮将生物膜样品研磨成粉末，转移 50-100mg 粉末至 2ml 匀浆管（2ml Bead Tubes）中。若样品比较微量，也可以不需液氮研磨，直接把样品撕碎并转移至匀浆管中。
2. 加入 500 $\mu$ l Buffer SPL 和 500 $\mu$ l Buffer PHC 至样品中，涡旋打散样品。65 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟，期间每隔 2 分钟剧烈振荡混匀 10 秒。
3. 在涡旋仪上最高速度涡旋混匀 10 分钟。
4. 加入 500 $\mu$ l 氯仿至裂解液中，剧烈涡旋混匀 15 秒。静置 5 分钟。
5. 室温下，12,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
6. 小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中，加入 2 倍体积的 Buffer RSL3。涡旋混匀 15 秒。
7. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。8,000  $\times$  g 离心 30 秒。
8. 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  $\times$  g 离心 30 秒。
9. (可选)参照第 7 页进行膜上 DNASE 消化以彻底去除 DNA 污染。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子上。8,000  $\times$  g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer RW2 至柱子中。8,000  $\times$  g 离心 30 秒。  
注：Buffer RW2 在使用之前，必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer RW2 至柱子中。8,000  $\times$  g 离心 30 秒。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。10,000  $\times$  g 离心空柱 2 分钟甩干柱子的基质。

14. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 30-50 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
15. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80 $^{\circ}$ C。

## 方案 2. 膜上 DNASE 消化步骤

虽然 HiPure Bacterial/Yeast RNA Kits 能有效去除基因组 DNA 的污染，但对于灵敏的下游应用，如 RT-PCR，微量的 DNA 污染都会带来很大的干扰。彻底去除 DNA 污染，可以使用 DNase I 消化来达到目的。HiPure Bacterial/Yeast RNA Kit 提供了一种快速简单的膜上 DNase 消化方案。

1. 根据样品类型，按方案 1 中步骤进行匀浆、上柱吸附 RNA。
2. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 400 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子上。**10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
3. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。按下表配制 DNase I 反应液，轻轻混匀。  
(注：取出 RNA 柱子时，不要让柱子的底部接触到溶液)

成分	用量
DNase Buffer	90 $\mu$ l
DNase I(20Units/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l

4. 把 DNase I 反应液加到 RNA 结合柱的膜中央。25-37 $^{\circ}$ C 静置 15-20 分钟。  
DNase I 反应液须加入柱子膜中央，不要加到壁上。
5. **加 500 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子中。**静置 2 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 600 $\mu$ l Buffer RW2 至柱中，**10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
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。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。**加入 600 $\mu$ l Buffer RW2 至柱中，**10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
8. 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。
9. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。**加入 30-50 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子膜中央。**静置 2 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

## 常见问题回答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。另外，Magen 的技术人员也可以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
<b>RNA 产量低</b>	
细菌或酵母细胞壁去除不彻底	延长溶菌酶或破壁酶消化时间，或增加溶菌酶或破壁酶的用量。加入玻璃珠高速涡旋进一步裂解细菌或酵母。
样品起始用量太多	细菌或酵母用量不要太多
细菌或酵母培养时间过长	确保细菌或酵母的培养时间不要过长，培养液处于指数期。
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 没有加到膜上，或洗脱体积不够。再加入 30-50 $\mu$ l RNase Free Water 到膜上，室温静置 2 分钟，然后离心洗脱 RNA。
培养液没有彻底去除	从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。
Buffer RW2 没有加入乙醇稀释	使用前，Buffer RW2 必须加入无水乙醇进行稀释
70%乙醇加入体积不准确	测量上清液的体积，加入等倍体积的 70%乙醇。处理肝脏和脾脏样品时，用 50%乙醇代替 70%乙醇有利于提高产量。
<b>RNA 降解</b>	
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。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染。
<b>DNA 污染</b>	
没有进行 DNase I 消化	不要省略 DNase I 膜上消化步骤，确保 DNase I 消化液全部加到膜中央。
氯仿抽提振荡不够	加入氯仿后，盖紧盖子。然后用手剧烈上下振荡 15 秒。不要用涡旋或颠倒混匀。
<b>下游实验结果不理想</b>	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 10,000 $\times$ g，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。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000 $\times$ 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。