

## HiPure Fungal RNA Mini Kit

真菌总 RNA 小提试剂盒

### 产品简介

本试剂盒珠磨法与柱法纯化技术相结合，适合从各种真菌生物样品中快速提取高纯度总 RNA。化柱优选高性能的超细玻璃纤维滤膜为材料，高效专一吸附 RNA。提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，整个提取过程只需 30 分钟。本产品适合于从  $\leq 1 \times 10^7$  个真菌培养液、孢子粉、大型真菌等样品中提取 RNA，提取的总 RNA 纯度高，基本没有蛋白和其它杂质的污染，可用于 RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

### 产品组份

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 Mini Column	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	5 x 100
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
氧化锆珠(0.6-0.8mm)	10 g	50 g	250 g
Buffer STL	10 ml	30 ml	120 ml
Buffer RLC	10 ml	30 ml	200 ml
Buffer RW1	10 ml	60 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

版本号：202401

## 保存条件

本产品可在室温(15~25°C)保存 18 个月。低温下, Buffer RLC 可能会有沉淀形成, 55°C 水浴让沉淀完全溶解。因 RNase Free Water 不含抑菌剂, 室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。推荐分装并保存于 2~8°C, 以减少污染。

## 准备事项

- 在 Buffer RW2 中, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 于室温保存。
- (可选)提升裂解液的变性能力: 使用前分装适量的 Buffer RLC/STL, 按每 ml Buffer RLC/STL 加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP, 该混合液室温可保存 1 周。

## 实验方案 A: 液体真菌 RNA 提取

该方案采用氧化锆珠珠磨裂解真菌细胞壁, 适合于从液体培养酵母、培养真菌、菌丝体、孢子粉、微量真菌、寄生真菌等粉末状或细胞状真菌样品中提取高纯度的总 RNA。

### 1. 真菌样品的收集:

- **液体培养菌丝体 (<1 $\times$  10<sup>7</sup>):** 取 0.5~1.8ml 真菌培养液至 2.0ml 离心管, 13,000  $\times$  g 离心 3 分钟收集真菌, 倒弃培养液。
- **固体培养菌丝体 (<1 $\times$  10<sup>7</sup>):** 加入 1.5~1.8ml 生理盐水或 PBS 从固体培养基上刮洗出菌丝体, 并转移至 2.0ml 离心管中, 13,000  $\times$  g 离心 3 分钟收集真菌, 倒弃上清液。
- **真菌粉末(孢子粉):** 转移 30~50mg 孢子粉至 2.0ml 离心管中。

### 2. 向含样品的离心管中, 加入 0.4ml Buffer STL/2-巯基乙醇和一勺氧化锆珠[0.6-0.8mm], 盖紧盖子。

按 1ml 裂解液 STL 加入 20 $\mu$ l 2-巯基乙醇、20 $\mu$ l 1M DTT 或 1M TCEP。采用珠磨仪时, 建议使用收集真菌时, 用螺口冻存管代替 2ml 离心管, 以防止液体泄漏。

### 3. 转移样品至涡旋仪上最高速度涡旋 10 分钟, 或转移至珠磨仪进行高速珠磨 30-60 秒。

- 涡旋仪: 推荐使用美基涡旋仪 MagMix A, 这台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具, 可一次高效处理 10~20 个样品。实验室常用的涡旋仪或带振荡功能的恒温金属浴也可以使用, 使有恒温

金属浴时需要 2ml 离心管中，让管子间的摩擦力防止管子无效旋转减少珠磨效果。

- Powerlyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
  - FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
  - Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
4. 短暂离心收集液滴，加入 0.4ml Buffer RLC 至样品中，涡旋混匀 10 秒。
  5. 室温下，13,000 × g 离心 5 分钟。
  6. 把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。转移 0.6ml 上清液转移至过滤柱中。13,000 × g 离心分钟，弃去 gDNA 过滤柱。
  7. 加入 0.18ml 异丙醇至滤液中，用移液枪吸打 3~5 次。
  8. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。
  9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer RW1 至柱子上。13,000 × g 离心 30~60 秒。
  10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2 至柱子中，13,000 × g 离心 30~60 秒。
  11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2 至柱子中，13,000 × g 离心 30~60 秒。
  12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。13,000 × g 离心 2 分钟。
  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。室温静置 2 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。  
柱子最小的洗脱体积是 30µl，若 RNA 产量超过 30µg，推荐进行第二次洗脱。
  14. 弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C。

## 实验方案 B: 大型真菌 RNA 提取

该方案采用液氮研磨裂解真菌细胞壁的方法, 适合于从蘑菇、滤膜富集的真菌滤饼等样品中提取真菌总 RNA。

1. 用液氮将真菌研磨成粉末, 称取 50-100mg 粉末至 2.0ml 离心管中, 加入 0.7ml Buffer RLC, 立即涡旋 10~15 秒让样品充分分散。
  - 使用前按 1ml Buffer RLC 加入 20 $\mu$ l 2-巯基乙醇或 1M DTT 或 1M TCEP, 混合液室温可以保存 1 周。由于巯基乙醇气味很重, 可用无气味的还原剂 TCEP(货号 C175)代替。多数情况下, 不添加还原剂也可以得到完整的 RNA。
  - 研磨好的样品在称量、转移、存放或加入 RLC 之前都不能解冻, 否则 RNA 会降解。
  - 初次使用推荐样品量为 50~100mg, 根据结果调整用量, 易提取样品用量可达 200mg。
  - 失败样品: 由于真菌样品中代谢物质含量差异很大, 本方案虽然解决大部分的样品部分, 但本产品未能解决问题, 请订购 Buffer PSL 代替 Buffer RLC。
2. 室温下, 13,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
3. 把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中, 转移 0.6ml 上清液转移至过滤柱中。13,000  $\times$  g 离心分钟, 弃去 gDNA 过滤柱。
4. 加入 0.18ml 异丙醇至滤液中, 用移液枪吸打 3~5 次。
5. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子上。13,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2 至柱子中, 13,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2 至柱子中, 13,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
10. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~100 $\mu$ 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。弃去柱子, 把 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C。