

HiPure Soil RNA Kit B

土壤 RNA 小提试剂盒 B

产品简介

在环境样本 RNA 提取中，对提取效果影响最大的就是样本中广泛存在的腐殖酸等抑制因素。本试剂盒采用珠磨法和独特的缓冲液系统，适合于从不超过 500mg 土壤、底泥、水体滤膜、发酵液残渣等环境样本中提取微生物 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，纯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。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。

产品组份

产品编号	R4183-01B	R4183-02B	R4183-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
2ml Beads Tubes	10	50	250
DNase I	0.2 ml	0.6 ml	5 × 0.6 ml
DNase Buffer	1.8 ml	6 ml	30 ml
Buffer STL	8 ml	40 ml	180 ml
Buffer PCI	8 ml	40 ml	180 ml
Buffer SL	1.9 ml	10 ml	50 ml
Buffer GXP2	6 ml	20 ml	100 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2 *	5 ml	20 ml	2 × 50 ml
RNase Free Water	1.0 ml	10 ml	30 ml

版本号：202401

保存条件

本产品可在室温(15-25°C)保存 18 个月，长期保存时需置于 2-8°C。低温下，Buffer SDS 可能会有沉淀形成，55°C 水浴让沉淀完全溶解。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 氯仿
- 水饱和酚
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW1，并于室温保存
- 用无水乙醇稀释 Buffer GXP2，并于室温保存

方案 1. 土壤样品总 RNA 小量提取

该方案适合于从 200~500mg 土壤样品中提取高纯度的总 RNA。

1. 在 2ml Bead Tubes 中，加入~0.5g 土壤、0.1g 粪便、~0.5g 环境类样品、0.3ml 发酵悬浊液、0.3ml 微生物悬浊液等样品。
2. 加入 600µl Buffer STL 和 300µl Buffer PCI 至样品中，盖紧盖子。

干燥的环境类样品使用前，可以用筛网尽可能清除异物，如树叶、石头或小树枝。对于非常干燥的材料，如果样品材料吸收过多的裂解缓冲液，控制样品并适量增加 Buffer STL 的用量。对于非常潮湿的材料，在加入裂解缓冲液之前，可以离心后再去除多余的液体。控制样品用量以确定离心管有足够的空间进行珠磨裂解细胞壁。通常起始材料的减少也有助于提高裂解效率和提高 RNA 的纯度。

采用珠磨仪或水平转子的涡旋仪时，建议使用螺口冻存管，以防止液体泄漏。

3. 转移涡旋仪上最高速度涡旋混匀 10~15 分钟或珠磨仪上高速珠磨 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。裂解时间应尽可能短，以避免剪切的时间和尽量减少腐殖酸的释放。然而，

根据样品的不同，使用涡旋仪时，珠磨裂解时间增加到 15min 可能是有利的，可以根据目标菌群特性和下游应用来调整。

- 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. 室温下，12,000 × g 离心 3 分钟。
5. 转移 500µl 上清液至新的离心管中，加入 150µl Buffer SL，涡旋混匀 5-秒。12,000 × g 离心 3 分钟。
6. 转移 0.6ml 上清至新 1.5ml 离心管，加入 900µl Buffer GXP2，颠倒混匀 3-5 次。
7. 把 HiPure RNA Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。10,000 × g 离心 60 秒。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中，转移余下混合液至柱子中。10,000 × g 离心 60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中，加入 400µl Buffer RW1 至柱子。10,000 × g 离心 60 秒。取出柱子时不要颠倒或侧转，不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体，倒弃废液后，把柱子放回收集管中再离心一次。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。按下表配制 DNase I 反应液并混匀。

成分	用量
DNase Buffer	90 µl
DNase I (20Units/µl)	10 µl

11. 把 DNase I 反应液加到 RNA 柱的膜中央，室温(15-30°C)静置 15 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer RW1 至柱子上，静置 2 分钟。10,000 × g 离心 60 秒。
Buffer RW1 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。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2 至柱子。10,000 × g 离心 60 秒。
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。

14. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RW2 至柱子。10,000 \times g 离心 60 秒。
15. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。10,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
16. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 20-50 μ 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。
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 20 μ l，小于 20 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 10 μ g，推荐按第 16 步进行第二次洗脱以获得更高产量。
17. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80 $^{\circ}$ C。

RNA 完整性和纯度检测

完整性检测：用 0.5x TBE 电泳缓冲液配制 1.2%琼脂糖凝胶，RNA 上样量为 0.5~1.5 μ g，150V 电泳 15 分钟。电泳图上能看两条明显的 rRNA 条带，其中 28S rRNA 的亮度好明显亮于 18S rRNA，表明 RNA 条带完整不降解。

纯度 1：OD260/280 比值衡量蛋白质污染程度的指标。高纯度 RNA 的 OD260/280 比值为 2.0，但由于 OD260, OD280, OD230 会受到 pH 值的影响。本产品采用 RNase Free Water 溶解（DEPC 处理水），其 pH5.5-7.5 波动，OD260/280 比值为 1.9-2.1。

纯度 2：当 RNA 总量高于 10 μ g 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 μ g 时，A260/230 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3 μ g，A260/230 会低于 0.6。这是因为 Buffer RLC 和 Buffer RW1 含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值，因此 A260/230 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研发表明，低浓度异硫氰酸胍不影响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下，适量提高样品用量和裂解液用量，提高核酸浓度（核酸总量>10 μ g）时，OD260/230 可以明显改善。若您的研究项目需要最好的 A260/230 比值，您可以使用 MD025。MD025 全程不使用异硫氰酸胍，所以 A260/230 的比值更高。