

## HiPure Water RNA Kit

水体 RNA 提取试剂盒

### 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，适合于从不超过水体滤膜中提取微生物 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	R4186-01	R4186-02	R4186-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
gDNA Filter Midi Column	10	50	250
15ml Centrifuge Tubes	10	50	250
Glass Beads (0.1~0.6)	50 g	250 g	2 x 700 g
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
Buffer STL	40 ml	180 ml	2 x 400 ml
Buffer SL	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer PCI	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RLC	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	150 ml
Buffer RW2 *	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml

版本号：202401

## 保存条件

本产品可在室温(15-25℃)保存 18 个月，收到产品 Buffer PCI 需置于 2-8℃ 保存。低温下，Buffer STL 可能会有沉淀形成，55℃ 水浴让沉淀完全溶解。

## 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存

## 方案 1. 水体样品总 RNA 提取

1. 水体微生物的收集：用 0.45μm 滤膜或 0.22μm 滤膜过滤收集水体微生物。样品的体积取决于水体中颗粒含量和滤膜的孔径。采用 0.45μm，直径为 9cm 时，一次可处理 5-10L 的自来水。

可处理水样最大体积取决于样品（如来源和质量）和过滤膜（如类型、直径和孔径）。由于水样的浊度可以从清澈到高度浑浊不等。一般来说，可以处理大量的透明饮用水或饮用水，因为过滤器堵塞的可能性较低，可以处理 100 mL 到几升的体积。含有沉淀物或悬浮颗粒的浊水样，如粘土、淤泥或其他无机或有机物，可能导致过滤器堵塞，对于这些样本类型，建议使用 0.45μm 的过滤器。使用合适的过滤器，用直径为 25 mm 的过滤膜(0.2um 或 0.45μm)过滤富集水体中微生物。使用无菌镊子从过滤装置取下过滤装置滤膜，将滤膜卷入圆柱体（含菌的一面朝内）并插入 15ml 匀浆管。

2. 使用无菌镊子从过滤装置取下过滤装置滤膜，将滤膜卷入圆柱体（含菌的一面朝内）并插入 15ml 离心管中，然后加入 5 勺玻璃珠(0.1~0.6mm)。
3. 加入 3.0ml Buffer STL, 0.30ml Buffer SL 和 0.30ml Buffer PCI., 盖紧盖子，转移涡旋仪上最高速度涡旋混匀 10~15 分钟。
4. 室温下，4,000~5,000 x g 离心 10 分钟。
5. 转移 2.5ml 上清液新的离心管中，加入 1.5ml 异丙醇，颠倒混匀 6-8 次。

6. 取 gDNA Midi Column I 装在 15ml 收集管中,把全部混合液转移至 gDNA 过滤柱中。室温下, 4,000~5,000 × g 离心 3 分钟。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 1.0 ml Buffer RLC 于柱子中, 静置 5 分钟。室温下, 4,000~5,000 × g 离心 3 分钟, 弃去 gDNA 过滤柱。
8. 加入 0.5ml 无水乙醇至滤液中, 涡旋混匀 5-10 秒。
9. 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。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。10,000 × g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer RW1 至柱子中。10,000 × g 离心 60 秒。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 600µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。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。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 600µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 60 秒。
14. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
15. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 15-50µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。  
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 15µl, 小于 15µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 10µg, 推荐按第 16 步进行第二次洗脱以获得更高产量。
16. 丢弃 RNA 柱子, 把 RNA 样品保存-80°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 $\mu$ 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 $\mu$ g 时, OD260/230 一般都在 1.3-2.2; 当 RNA 总量在 5~10 $\mu$ g 时, A260/230 会在 0.7~2.0; 当 RNA 总量低于 3 $\mu$ 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 $\mu$ g) 时, OD260/230 可以明显改善。