

## HiPure Soil RNA Midi Kit

土壤 RNA 中提试剂盒

### 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 3~5g 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	R4184-01	R4184-02	R4184-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Column	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
gDNA Filter Midi Column	10	50	250
15ml Collection Tubes	10	50	250
氧化锆珠(0.6-0.8mm)	60 g	270 g	5 × 270 g
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
Buffer STL	70 ml	350 ml	3 × 550 ml
Buffer PCI	40 ml	180 ml	2 × 400 ml
Buffer SL	30 ml	80 ml	500 ml
Buffer RLC	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2 *	5 ml	20 ml	2 × 50 ml
RNase Free Water	1.0 ml	15 ml	60 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. 土壤样品总 RNA 中量提取

该方案适合于从 3~5g 土壤样品中提取总 RNA。

1. 在 15ml 离心管（自备）中，加入 5 勺（~5g）氧化锆珠（0.6-0.8mm），然后加入 3~5g 土壤、底泥、残渣、水体滤膜、或其它环境类生物样品。

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。

2. 加入 6.0 ml Buffer STL, 0.3ml Buffer SL 和 3.0ml Buffer PCI, 盖紧盖子，在涡旋仪上最高速度涡旋混匀 10~15 分钟。
3. 室温下，4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。
4. 转移 5ml 上清液至新离心管中，加入 1.5ml Buffer SL，涡旋混匀 10 秒。室温下，4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。
5. 转移 6ml 上清液新的离心管中，加入 3ml 异丙醇，颠倒混匀 6-10 次。

6. 取一个 gDNA Midi Column 装在 15ml 收集管中。把一半体积混合液转移至 gDNA 过滤柱中。室温下，4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。室温下，4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。
8. 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 x g 离心 3 分钟。弃去 gDNA 过滤柱。
9. 加入 0.5 ml 无水乙醇至滤液中，涡旋混匀 5 秒。
10. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积混合液至柱子中。室温下，10,000 x g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。把余下的混合液转移至柱子中。室温下，10,000 x g 离心 1 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 0.5ml Buffer RW1 至柱子上。室温下，10,000 x g 离心 1 分钟。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 0.5ml Buffer RW2 至柱子中。室温下，10,000 x g 离心 1 分钟。
14. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 0.5ml Buffer RW2 至柱子中。室温下，10,000 x g 离心 1 分钟。
15. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。室温下，10,000 x g 离心 2 分钟甩干柱子的基质。
16. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。加入 30-100 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。室温下，3,000-4,000 x g 离心 3 分钟。
17. 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 0.5~1.5ug, 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 10ug 时, OD260/230 一般都在 1.3-2.2; 当 RNA 总量在 5~10ug 时, A260/230 会在 0.7~2.0; 当 RNA 总量低于 3ug, A260/230 会低于 0.6。这是因为 Buffer RLC 和 Buffer RV1 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。研究表明, 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 > 10ug) 时, OD260/230 可以明显改善。