HiPure Yeast &Microboil RNA Kit

酵母和微生物 RNA 提取试剂盒

产 品 简 介

本产品采用热酚法和珠磨法，适合于酵母、细菌、真菌菌丝体或孢子粉等难裂解的微生物中提取高纯度总 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，整个提取过程只需 30~40 分钟。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	R4182-01	R4182-02	R4182-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
gDNA Filter Mini Column	10	50	250
HiPure RNA Mini Column I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
玻璃珠（0.1-0.6mm）	10 g	50 g	250 g
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
Buffer ATL	8 ml	30 ml	150 ml
Buffer PCI	8 ml	30 ml	150 ml
Buffer GDP	5 ml	20 ml	100 ml
Buffer RW2*	6 ml	20 ml	2 X 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml

保 存 条 件

本产品可在室温(15-25℃)保存 18 个月，Buffer PCI 需置于 2-8℃保存。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，推荐分装保存于 2~8℃，Buffer ATL、GDP 低温会有沉淀析出，使用前 55℃温浴、混匀。

实验步骤：酵母和微生物 RNA 提取

1. **离心收集微生物细胞。**

- **液体培养液：取 0.5~1.8ml 处于指数生长期的细菌、酵母或真菌培养液至 2.0ml 离心管或螺口离心管中，12,000 x g 离心 3 分钟收集真菌，倒弃培养液。**

  细菌：建议细胞数量不要超过 $1x10^9$ 或湿重不超过 30mg。

  酵母或真菌：建议细胞数量不要超过 $1x\ 10^7$ 或湿重不超过 100mg。

- **固体培养液：**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 离心管或螺口离心管中，12,000 x g 离心 3 分钟收集真菌，倒弃上清液。

- **孢子粉或菌粉：**取 30-100mg 孢子粉或菌粉至 2.0ml 离心管或螺口离心管中。

- **大体积体液（低细胞含量）：**取 1~1.8ml 血清、血浆、积液、培养液上清、痰液液化液、分泌液、尿液、灌洗液、唾液等至 2.0ml 离心管或螺口离心管中，12,000 x g 离心 10 分钟收集微生物细胞，倒弃液体。

2. **加入一勺玻璃珠（0.1~0.6mm）至含微生物沉淀的离心管中。**

3. **加入 0.45ml Buffer ATL 和 0.45ml Buffer PCI，盖紧盖子，转移至涡旋仪上最高速度涡旋 10 分钟或珠磨仪进行快速珠磨 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，让管子间的磨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. 室温下，12,000 x g 离心 5 分钟。
5. 转移 300μl 上清液至新的离心管中，加入 300μl Buffer GDP，颠倒混匀 6-8 次。
6. 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至 gDNA 过滤柱中。12,000 x g 离心 30~60 秒。
7. 丢弃 gDNA 过滤柱，加入 180μl 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。12,000 x g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × 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，12,000 × g 离心 30~60 秒。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 x g 离心 2 分钟。
12. 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。12,000 × 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。
13. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80℃。

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%琼指糖凝胶，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 GDP 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>10ug)时，OD260/230 可以明显改善。