

HiPure Soil RNA Mini Kit

土壤 RNA 小提试剂盒

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 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	R4183-01	R4183-02	R4183-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
gDNA Filter Mini Column	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
2ml Beads Tubes	10	50	250
Buffer SOL	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer SDS	1 ml	4 ml	15 ml
Buffer PHC	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer GDP	10 ml	40 ml	150 ml
Buffer RBL	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer RWC*	10 ml	50 ml	2x125 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，长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer SDS 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%)
- 氯仿
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存
- 用无水乙醇稀释 Buffer RWC，并于室温保存

方案. 土壤总 RNA 提取

1. 在 2ml Bead Tubes 中，加入 0.3~0.5g 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 500µl Buffer SOL、50µl Buffer SDS 和 500µl Buffer PHC 至样品中，盖紧盖子。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。
3. 短暂离心，加入 200µl 氯仿至裂解液中，涡旋混匀 10 秒。
4. 室温下，12,000 × g 离心 10 分钟。
5. 小心转移上清液(~0.4ml)至新的 1.5ml 离心管中。加入等倍体积的 Buffer GDP，颠倒混匀

6-8 次。

6. 取一个 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。把混合液转移至 gDNA 过滤柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
7. 弃去 gDNA 过滤柱，加入等体积 Buffer RBL 至滤液中，用移液器吸打混匀 3-5 次。
8. 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 30-60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余的混合液至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RWCV 至柱子。10,000 × g 离心 30-60 秒。
Buffer RWCV 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。
11. 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 30-60 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。
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 30-60 秒。
13. 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。
14. 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。
15. 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。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。