

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1:土壤 RNA 小量抽提	5
方案 2:土壤 RNA 中量抽提	5
常见问题回答	8

版本: 2018-01

简介

HiPure Soil RNA Kits 适合于从土壤样品中提取高纯度微生物总 RNA。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，并结合独创的腐殖酸吸附剂技术，适合于从各种土壤，如森林土壤，草地土壤，矿区土壤，底泥等样品中提取高产量高纯度的总 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。

	Soil RNA Mini Kit	Soil RNA Midi Kit
产品编号	R4183	R4184
土壤处理量	0.5g	3g
结合力	20 µg	500 µg
洗脱体积	15-50 µl	100-200 µl
柱子类型	小柱(1.5ml)	中量(15ml)

原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。

HiPure Soil RNA Kit 适合于从土壤样品中提取微生物总 RNA。生物膜经裂解液和珠磨法匀浆裂解微生物。RNA 释放到裂解液中。加入氯仿抽提去除蛋白质，转移上清液并用乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，RNA 被吸附在柱子的膜上，而杂质不被吸附而去除。柱子经 Buffer RWC 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后用 RNase Free Water 洗脱出 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。

保质期

HiPure Soil RNA Kit 组分可在室温下(15-25°C)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8°C。因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装 RNase Free Water 并保存于 -20°C，以减少污染。

组成

HiPure Soil RNA Mini Kit

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
2ml Collection Tubes	20	100	500
gDNA Filter Column	10	50	250
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

HiPure Soil RNA Midi Kit

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
1.5ml Collection Tubes	10	50	250
1.5ml Beads Tubes	10	50	250
Buffer SOL	30 ml	150 ml	2 x 350 ml
Buffer SDS	3 ml	20 ml	70 ml
Buffer PHC	30 ml	150 ml	2 x 350 ml
Buffer GDP	30 ml	200 ml	2 x 350 ml
Buffer RBL	60 ml	250 ml	3 x 400 ml
Buffer RWC*	40 ml	2x100 ml	2 x 400 ml
Buffer RW2 *	20 ml	4 x 50 ml	4 x 100 ml
RNase Free Water	10 ml	50 ml	250 ml
说明书	1	1	1

方案 1. 土壤样品总 RNA 小量提取

该方案适合于从 500mg 土壤样品中提取高纯度的总 RNA。

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 RWC, 并于室温保存
1. 称取 500mg 土壤样品至 2ml Bead Tubes 中, **加入 500 μ l Buffer SOL、50 μ l Buffer SDS 和 500 μ l Buffer PHC 至样品中**, 在涡旋仪上最高速度涡旋混匀 10 分钟。
这一步最好用珠磨仪(Fastprep-24)来匀浆样品。匀浆时间和速度参照仪器的说明书。
 2. 短暂离心。**加入 200 μ l 氯仿至裂解液中**。剧烈涡旋混匀 15 秒, 静置 5 分钟。
 3. 室温下, 12,000 \times g 离心 5 分钟。
 4. 小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。**加入等倍体积的 Buffer GDP 至上清液中**。涡旋混匀 20 秒。
 5. 取一个 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。把混合液转移至 gDNA 过滤柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
 6. 弃去 gDNA 过滤柱。**加入等倍体积 Buffer RBL 至滤液中**。吸打混匀 5-10 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 \times g 离心 30-60 秒。
 8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
 9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子上**。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RWC 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。
 10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 600 μ l 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。

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。
12. 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。
13. 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。
14. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80°C。

方案 2. 土壤样品总 RNA 中量提取

该方案适合于从 3g 土壤样品中提取总 RNA。

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 RWC, 并于室温保存

1. 转移 3g 土壤样品至 15ml Bead Tubes 中, **加入 2.5ml Buffer SOL、250 μ l Buffer SDS 和 2.5ml Buffer PHC 至土壤样品中**。在涡旋仪上最高速度涡旋混匀 10 分钟。
这一步最好用珠磨仪(Fastprep-24 或 Tissue Lyser)来匀浆样品。匀浆时间和速度参照仪器的说明书。
2. **加入 1ml 氯仿至裂解液中**。剧烈涡旋混匀 15 秒, 静置 5 分钟。
3. 室温下, 3,000-4,000 x g 离心 15 分钟。
4. 小心转移上清液至新的 15ml 离心管中。**加入等体积的 Buffer GDP 和无水乙醇至上清液中**。涡旋混匀 15 秒。
5. 取一个 gDNA Filter Midi Column I 装在 15ml 收集管中。把一半体积的混合液转移至 gDNA 过滤柱子中。室温下, 3,000-4,000 x g 离心 3 分钟。
6. 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, 3,000-4,000 x g 离心 3 分钟。
7. 加入 0.5ml Buffer GDP 于柱子中, 静置 2 分钟。室温下, 3,000-4,000 x g 离心 3 分钟。弃去 gDNA 过滤柱。
8. **加入 0.5 倍体积无水乙醇至滤液中**, 涡旋混匀 15 秒。
9. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至柱子中**。室温下,

10,000 × g 离心 1 分钟。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 0.6ml Buffer RWC 至柱子上。**室温下, 10,000 × g 离心 1 分钟。

Buffer RWC 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 0.5ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**室温下, 10,000 × g 离心 1 分钟。

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 0.5ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**室温下, 10,000 × g 离心 1 分钟。

13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。室温下, 10,000 × g 离心 1 分钟甩干柱子的基质。

14. 将柱子转移至新的 15ml 离心管中。**加入 30-100µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。室温下, 3,000-4,000 × g 离心 3 分钟。

15. 丢弃 RNA 柱子, 把 RNA 样品保存-80°C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们，我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
RNA 产量低	
土壤裂解不充分	建议采用高能量的珠磨仪进行研磨。使用普通涡旋仪时，要把速度调到最大，以达到充分涡旋的目的。
样品起始用量太多	土壤样品太多，样品没有达到充分涡旋或混匀的目的。
土壤样品 RNA 含量低	不同的土壤 RNA 含量较异非常大
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 没有加到膜上，或洗脱体积不够。增加洗脱液的体积
Buffer RW2 没有加入乙醇稀释	使用前，Buffer RW2 必须加入无水乙醇进行稀释
RNA 降解	
样品用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染。
DNA 污染	
没有进行 DNase I 消化	不要省略 DNASE I 膜上消化步骤，确保 DNase I 消化液全部加到膜中央。
氯仿抽提振荡不够	加入氯仿后，盖紧盖子。然后用手剧烈上下振荡 15 秒。不要用涡旋或颠倒混匀。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 10,000xg，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。