



通用型粪便/土壤RNA小提试剂盒(BW-R6911)

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、PolyA纯化，核酸保护和体外翻译等实验。

KIT CONTENTS

产品编号	R6911-01	R6911-02	R6911-03
纯化次数	10次	50次	250次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
2ml Beads Tubes	10	50	250
DNase I	0.2ml	0.6ml	5x0.6ml
DNase Buffer	1.8ml	6ml	30ml
Buffer STL	8ml	40ml	180ml
Buffer PCI	8ml	40ml	180ml
Buffer SL	1.9ml	10ml	50ml
Buffer GXP2	6ml	20ml	100ml
Buffer RW1	10ml	50ml	250ml
Buffer RW2 *	5ml	20ml	2x50ml
RNase Free Water	1.0ml	10ml	30ml

产品贮存及稳定性

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

- 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 GW1，并于室温保存
- 用无水乙醇稀释 Buffer GXP2，并于室温保存

操作步骤

该方案适合于从200~500mg土壤样品中提取高纯度的总RNA。

1. 在2ml Bead Tubes中，加入~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600 μ l Buffer STL和300 μ l Buffer PCI至样品中，盖紧盖子。

☆：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。

☆：采用珠磨仪或水平转子的涡旋仪时，建议使用螺口冻存管，以防止液体泄漏。

3. 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。

4. 室温下，12,000xg离心3分钟。

5. 转移500 μ l上清液至新的离心管中，加入150 μ l Buffer SL，涡旋混匀5-秒。
12,000xg离心3分钟。

6. 转移0.6ml上清至新1.5ml离心管，加入900 μ l Buffer GXP2，颠倒混匀3-5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。10,000xg离心60秒。

8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中,转移余下混合液至柱子中。10,000xg离心60秒。

9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中,加入400μl Buffer RW1 至柱子。10,000xg离心60秒。
取出柱子时不要颠倒或侧转,不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体,倒弃废液后,把柱子放回收集管中再离心一次。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。按下表配制 DNase I 反应液并混匀。

成分	用量
DNase Buffer	90 μl
DNase I (20Units/μl)	10 μl

11. 把DNase I反应液加到RNA柱的膜中央, 室温(15-30°C)静置15分钟。

12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入500μl Buffer RW1 至柱子上, 静置2分钟。
10,000xg离心60秒。

☆: Buffer RW1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。加入500μl Buffer RW2 至柱子。10,000xg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。

14. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入500μl Buffer RW2至柱子。10,000xg离心60秒。

15. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。10,000xg离心空柱3分钟甩干柱子的基质。

16. 将柱子转移至1.5ml离心管中。加入20-50μl RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置2分钟。10,000xg离心1分钟。

☆: HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是20μl, 小于20μl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。

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28SrRNA的亮度好明显亮于18SrRNA，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 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。

购买须知

根据说明书使用时，本产品应按其标签和倍沃的文献中所述执行。倍沃不提供任何其他类型的明示或暗示，包括但不限于适销性或适合某一特定目的的保证。在选择倍沃时，违反本保证的，倍沃唯一的义务和买方的唯一补救措施是更换产品，倍沃应当没有任何直接或间接的，或使用引起的附带损害，或无法使用它产品的责任。如需技术支持或了解更多产品信息，请致电与我们联系，或访问我们的网站



全国服务热线：400-115-2855

技术邮箱：tech@beiwobiomedical.com

市场邮箱：market@beiwobiomedical.com

倍沃官网：www.beiwobiomedical.com