

# 土壤/粪便RNA提取试剂盒

使用说明书 (Ver.1.0.6)

## 产品特点

- ◇ 可在10分钟内快速从各种土壤或粪便样品中提取到最多10 $\mu$ g总RNA。
- ◇ 产品无需使用蛋白酶K，结合高密度裂解柱和纯化柱技术进行提取。
- ◇ 获得的RNA产量高、纯度好，可直接用于酶切、PCR、芯片，高通量测序等分子生物学实验。

产品货号：

TR204-50 (50次反应)    TR204-D-50 (50次反应 含DNase I)



扫描二维码了解更多产品信息

# 目录Contents

产品组份	1
注意事项	1
产品特性	2
产品描述	2
溶液制备	3
操作步骤	3
附录	4
DNase I处理（柱内）	4
FAQ常见问题及解决方法	5
组件查询	6

## 产品组份

试剂盒组成	TR204-50	TR204-D-50	保存
S/F RNA裂解液	50ml	50ml	室温
RNA结合液	50ml	50ml	室温
RNA预洗液	25ml*2	25ml*2	室温
RNA洗涤液	24ml	24ml	室温
无DNase/RNase水	6ml	6ml	室温
DNase I	-	250U	-20°C
DNA消化液	-	4ml	室温
抑制物去除液	30ml	30ml	室温
裂解管	50个	50个	室温
3号CG纯化柱	50个*2	50个*2	室温
1号C纯化柱	50个	50个	室温
抑制物去除柱	50个	50个	室温
收集管 (2ml)	200个	200个	室温

## 注意事项

1. 此产品仅供研究使用，仅供训练有素的专业人员使用。
2. 试剂盒中包含的一些试剂是刺激物，请带好手套和防护眼镜。
3. 售出后一年内产品质量是可以保证，试剂盒已经过大量的常规检测来保证其可操作性。
4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

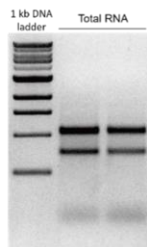
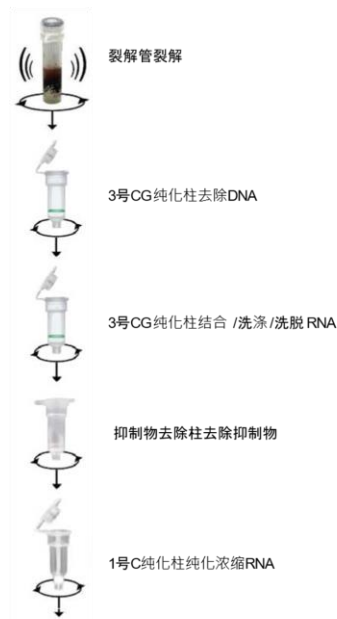
## 产品特性

- ◇ 样品：可有效的从250mg以内的土壤或粪便中提取到总RNA。
- ◇ RNA纯度：获得的RNA产量高、纯度好，可以直接用PCR，高通量测序等各种分子生物学实验。回收的RNA里可能会有微量的DNA残留，如要完全去除可用DNase I采用柱上消化方法。
- ◇ 操作时间：10分钟。
- ◇ 操作温度：室温（15-30°C）。
- ◇ 可对包含small/microRNAs（≥17nt）在内的总RNA进行回收。
- ◇ 纯化柱最大结合量10µg，最小洗脱体积6µl。
- ◇ 所需设备：微型离心机，涡旋仪或细胞破碎仪。

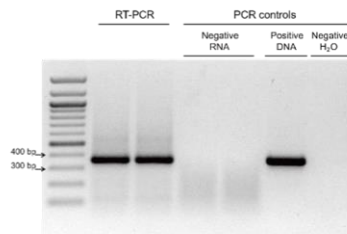
## 产品描述

- ◇ 土壤/粪便RNA提取试剂盒是一种用于从高达250毫克的土壤（污泥、沉积物等）、粪便样品（哺乳动物、鸟类等）中快速分离包括小RNA (>17nt) 在内的总RNA试剂盒，这些样品含有难以裂解的细菌、真菌、原生动、原生生物、藻类、病毒包括宿主细胞。
- ◇ 该试剂盒采用独有的裂解管，并搭配独特的S/F RNA裂解液。以及高结合量的纯化柱，可有效的吸附和浓缩提取得到的总RNA。
- ◇ 将RNA洗涤，然后用DNase/RNase-Free水洗脱。为了去除抑制剂，洗脱的RNA可以通过抑制物去除柱进行处理。

有效地从任何土壤或粪便样本中回收RNA



粪便/土壤RNA提取试剂盒从250 mg污泥中分离总RNA。



节肢杆菌 (*Arthrobacter* sp.) rRNA转录物(361 bp片段)的PCR扩增。  
对照:阴性对照——从250mg污泥中分离总RNA(见上图)。  
阳性对照-节杆菌基因组DNA。阴性对照-水。

## 溶液制备

- ✧ RNA洗涤液在使用之前一定要配好，添加100ml无水乙醇到25ml的RNA洗涤液中并做好标记。
- ✧ 需要添加96ml 100%的乙醇（或104ml 95%乙醇）到24ml的DNA/RNA洗涤液中。
- ✧ 溶解冻干粉状态的DNase I需要按照管子上的量添加RNase-free H<sub>2</sub>O。
- ✧ 一般250U的DNase I需要添加275μl的DNase/RNase-free H<sub>2</sub>O，终浓度为1U/μl。

## 操作步骤

以下离心步骤的离心力均在10,000-16,000xg下进行，除非特殊说明。

1. 直接添加250mg以内的样品到裂解管中，然后添加1ml的S/F RNA裂解液到裂解管中，在涡旋仪上振荡2分钟以内混匀。（如果使用高频振荡器时间可以适当缩短）
2. 将裂解管离心1分钟。
3. 将上述步骤中400μl上清转移到一个干净的1.5ml离心管内，添加等体积的RNA结合液到离心管内，混匀。
4. 将上述步骤的混合物转移到3号CG纯化柱内，3号CG纯化柱套在一个收集管内，在3,000xg下离心1分钟。保留滤出液。
5. 添加等体积（95-100%）的无水乙醇（约800μl）到上一步（步骤4）收集管中的滤出液中，混匀。
6. 将上述混合液（步骤5）添加到一个新的3号CG纯化柱中，3号CG纯化柱套在一个收集管内，离心1分钟。去除滤出液。（柱子的最大承载量是800μl，超过此体积需反复过柱）
7. 添加400μl RNA预洗液到纯化柱中，离心1分钟。将纯化柱移至一个干净的1.5ml离心管中。
8. 添加100μl的RNase-free H<sub>2</sub>O到纯化柱基质上，离心1分钟洗脱RNA。
9. 把抑制物去除柱套在一个干净的收集管中，添加600μl的抑制物去除液，在≥8,000xg下离心3分钟。
10. 把抑制物去除柱套在一个干净的1.5ml离心管中，将洗脱的RNA放入抑制物去除柱，并在16,000xg下离心3分钟。
11. 添加200μl RNA结合液到上述步骤（步骤10）的滤出物中，混匀。
12. 添加等体积~300μl（95-100%）的无水乙醇到上述混合液（步骤11），混匀。
13. 将上述混合液（步骤12）转移到1号C纯化柱中，1号C纯化柱套在一个收集管内，离心1分钟。去除滤出液。
14. 添加400μl RNA预洗液到纯化柱中，离心1分钟。去除滤出液。
15. 添加700μl RNA洗涤液到纯化柱中，离心1分钟。去除滤出液。
16. 添加400μl RNA洗涤液到纯化柱中，离心2分钟确保完全去除洗涤液。
17. 将1号C纯化柱移至干净的1.5ml离心管中直接添加15μl的RNase-free H<sub>2</sub>O到纯化柱基质上，离心1分钟来洗脱RNA，得到的RNA可进行后续PCR、高通量测序等试验或放在-80°C以下保存。

## 附录

### DNA/RNA保护剂 (EZshield®) 中的样本提取

如果冷冻保存，需将保存在DNA/RNA保护剂 (EZshield®) 中的样品解冻至室温(20-30°C)。旋涡均匀。

#### 均质化样本

1. 将400µl保存在DNA/RNA保护剂 (EZshield®) 中的匀浆样品转移到新的无RNase管中 (未提供)
2. 加入等体积的S/F RNA裂解液 (1:1) ，混合均匀。
3. 进行总RNA纯化 (第3页，步骤2)

#### 非均质化样本

1. 将800µl-1ml悬浮在DNA/RNA保护剂 (EZshield®) 中的样品转移到裂解管中
2. 在涡旋仪上振荡2分钟以内混匀。(如果使用高频振荡器时间可以适当缩短)
3. 将裂解管高速离心1分钟 (例如, 16,000xg)
4. 将400µl上清转移到新的无RNase管中 (未提供) 。
5. 在上清液中加入400µl S/F RNA裂解液 (1:1) ，混合均匀。
6. 继续进行总RNA纯化 (第3页，步骤3) 。

## DNase I处理 (柱内)

用DNase I和RNA洗涤液 (浓缩液) 进行DNase I处理，除非特殊说明，所有步骤均在室温下进行，并在10,000-16,000xg离心30秒

1. 按照RNA结合步骤 (第3页，步骤12) ，向柱中加入400µl RNA洗涤液，离心并弃掉滤液。
2. 对于每个待处理的样品，在无RNase管 (未提供) 中准备DNase I反应混合物 (见下表) ，并通过温和倒置混匀。然后直接加入40µl到纯化柱基质中，室温 (20-30°C) 孵育15分钟。继续进行纯化 (第3页，步骤13) 。

DNase I反应混合物	
DNase I (1U/µl)	5µl
DNA消化液	35µl

使用前，用275µl DNase/rase-free Water溶解冻干的DNase I。用温和的倒转方式混合，然后分装储存。

## FAQ常见问题及解决方法

Q: 问题	A: 可能的原因和推荐的解决方案
存在沉淀，粘性裂解物	<p>◇ 不完全裂解/样本量过大： 如果出现沉淀（在裂解液中加入乙醇后）或裂解液非常粘稠，请增加DNA/RNA保护剂（EZshield®）或S/F RNA裂解液的体积，以确保完全裂解和均质，直到裂解液透明(见图)。</p> 
低纯度 (A260/A230 nm, A260/A280 nm)	<p>◇ 样品处理： 乙醇或盐污染。离心步骤后，小心地从收集管中取出纯化柱，以防止缓冲液污染。 或者，用纸巾或毛巾吸干收集管。 确保裂解液和洗涤液已完全通过纯化柱的基质。这可能需要以更高的速度或更长的时间进行离心</p> <p>◇ 不完全裂解或细胞碎片： 按比例增加DNA/RNA保护剂（EZshield®）或S/F RNA裂解液的体积，以确保完全裂解和均质。一定要离心彻底，然后处理清除的裂解物。</p>
低得率	<p>◇ 样品投入： 过多的样品投入或不完全的裂解会导致细胞碎片堵塞或使回收过载，导致核酸恢复受损。使用较少的样本或增加DNA/RNA保护剂（EZshield®）或S/F RNA裂解液的体积。</p> <p>◇ 高蛋白： 纯化前对样品进行蛋白酶K处理。见相应的样品制备方案。</p>
DNA污染	<p>◇ 去除DNA： 纯化后进行管内DNase I处理，然后，在50µl反应混合物中加入150µl S/F RNA裂解液（3:1），混合均匀。加入等体积乙醇（95-100%）（1:1）混合均匀。进入净化步骤6，第3页。</p>
RNA降解	<p>◇ 防止RNA降解： 立即收集和裂解新鲜样品到DNA/RNA保护剂（EZshield®）或S/F RNA裂解液确保稳定性。均质后的样品可以冷冻保存以备以后处理。</p>

## 组件查询

试剂盒单独组分	货号	规格	保存
S/F RNA裂解液	TR2040-1-50	50ml	室温
RNA结合液	TR1013-2-50	50ml	室温
RNA预洗液	TR1060-2-25	25ml	室温
RNA洗涤液	TR1003-3-24	24ml	室温
无DNase/RNase水	TW1001-6	6ml	室温
DNase I	TE1009-A	250U	-20°C
DNA消化液	TE1010-1-4	4ml	室温
抑制物去除液	TD6035-1-30	30ml	室温
裂解管	TS6012-50	50个	室温
3号CG纯化柱	TC1006-50-G	50个	室温
1号C纯化柱	TC1004-50	50个	室温
抑制物去除柱	TC1058-50	50个	室温
收集管 (2ml)	TC1001-200	200个	室温