

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:从粪便样品提取总 RNA	5
方案 2:膜上 DNase 消化去除 DNA	7
常见问题回答	8

版本: 2017-01

简介

HiPure Stool RNA Kit 是专门为粪便 RNA 提取而设计的。试剂盒适合于从 $\leq 0.1\text{g}$ 的粪便样品中提取高纯度的微生物或宿主细胞 RNA。试剂盒采用硅胶柱纯化技术和独创的溶液体系，可高效地去除粪便样品中的腐殖酸等抑制因子。纯化的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern 杂交等实验。

原理

HiPure 硅胶柱是采用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因素吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，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。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

粪便样品在裂解液中匀浆，高温水浴进一步裂解，RNA 释放到裂解液中。氯仿抽提去除基因组 DNA 和杂质，转移上清液加入无醇结合液，过柱子纯化 RNA，最后 RNA 被 RNase Free Water 洗脱。洗脱的 RNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交、酶切等实验。

组 成

HiPure Stool RNA Kit

产品编号	R4185-01	R4185-02	R4185-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Glass Beads (0.1~0.6mm)	8 g	30 g	150 g
Buffer SPL	10 ml	30 ml	140 ml
Buffer PHC	10 ml	30 ml	140 ml
Buffer GRP	10 ml	60 ml	250 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	1.5 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure Stool RNA Kit 组份可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需放置于 2-8℃。低温下，Buffer SPL 可能会有沉淀形成，需 55℃水浴让沉淀完全溶解。收到产品后，Buffer PHC 保存于 2~8℃。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管和无 RNase 酶的枪头
- 涡旋仪
- 小型离心管(<10,000 xg)
- (可选)65°C 水浴锅
- 氯仿
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。

R4185-01	加入 20 ml 无水乙醇
R4185-02	加入 80 ml 无水乙醇
R4185-03	每瓶中加入 200 ml 无水乙醇

方案 1. 从粪便样品提取微生物 RNA

该方案适合于从 100-200mg 粪便样品中提取 RNA，如细菌 RNA 或宿主 RNA。

1. 在 2ml 离心管中，加入~0.5g 玻璃珠(0.1~0.6mm)。
2. 取 100-150mg 粪便样品至装有玻璃珠的离心管中。若样品为液体，吸取 0.1ml 样品至 2ml 离心管中。吸取时，把 1ml 枪头的头部剪去以方便转移。
处理富含纤维的动物粪便样品(牛羊等)，样品量控制在 50~100mg，处理水份极少的动物粪便(如老鼠粪便)，样品量为 30~60mg。
3. 立即加入 0.5ml Buffer SPL 和 0.5ml PHC 至样品中，最高涡旋 10 分钟打散样品。65°C 水浴 15 分钟，期间每隔 1 分钟涡旋混匀 5 秒。
只需提取宿主细胞 RNA 时，省略这一步可以减少细菌 RNA 的干扰。
4. 加入 0.5ml 氯仿至裂解液中，涡旋混匀 15 秒。室温放置 5~10 分钟。
5. 室温下，12,000 × g 离心 5 分钟。
6. 小心转移上清液至新的离心管中。加入 2 倍体积 Buffer GRP 至上清液中。涡旋混匀 10 秒。
7. 把 HiPure RNA Column 装在 2ml 收集管中。转移一半混合液至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。把剩余混合液转移至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer RW1 至柱子上。10,000 × g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。
Buffer RW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。再加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。
12. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。12,000 × g 离心 2 分钟。

13. 将柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 30-50 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。放置 1 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 丢弃 RNA 结合柱，保存于-80 $^{\circ}$ C。

可选方案. 膜上 DNASE 消化步骤

虽然 HiPure Stool RNA Kit 能有效去除基因组 DNA 的污染, 但对于灵敏的下游应用, 如 RT-PCR, 微量的 DNA 污染都会带来很大的干扰。彻底去除 DNA 污染, 可以使用 DNASE 消化来达到目的。需另外购买 DNase On Column Kit。

1. 根据样品类型, 按方案 1 中步骤进行匀浆、上柱吸附 RNA。
2. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 400 μ l Buffer RW1 至柱子上。**10,000 \times g 离心 1 分钟。
3. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。按下表配制 DNase I 反应液, 轻轻混匀。
(注: 取出 RNA 柱子时, 不要让柱子的底部接触到溶液)

成分	用量
DNase Buffer	60 μ l
DNase I(20Units/ μ l)	10 μ l

4. 把 DNase I 反应液加到 RNA 结合柱的膜中央。25-37 $^{\circ}$ C 静置 15-20 分钟。
DNase I 反应液须加入柱子膜中央, 不要加到壁上。
5. **加 500 μ l Buffer RW1 至柱子中。**静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
6. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。**加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中,**10,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer RW2 在使用之前, 须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。**加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱中,**10,000 \times g 离心 1 分钟。
8. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
9. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。**加入 30 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。**静置 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 弃去柱子, 把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ 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。此外，Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学上碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽全力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
柱子堵塞	
样品起始用量太多	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 产量低	
洗脱效率不够	洗脱时 RNase Free Water 加到膜中央。DEPC Water 的洗脱体积不够。增加 RNase Free Water 洗脱的次数。
Buffer RW2 中乙醇没有加入或加不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
柱子没有空甩	柱子必须甩 2 分钟以去除膜上残留的乙醇。
样品消化不充分	推荐使用 2ml 匀浆管对样品进行匀浆，以提高粪便分散效果。
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 10,000rpm，离心时间为 10 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到溶液中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。