



ANBIOSCI TECH LTD



RNA PowerSoil® Total RNA Isolation kit

强力土壤® 总 RNA 提取试剂盒

货号	提取次数
12866-25	25 次

操作步骤更新:

- (步骤 3-5) 酚氯仿 (pH6.5-8.0, [用户自备]) 从原来 5min 涡旋震荡后加入, 改为涡旋振荡前加入。
- (步骤 12) 步骤 12 的孵育改为在室温下进行。若原来 -20℃ 温度下孵育能获得理想得率, 你可维持原温度孵育。

简介

RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit 专门设计用于提取土壤微生物总 RNA。试剂盒性能优越, 能始终如一地去除腐植酸、富里酸等 RT-PCR 抑制因子获得纯净的, 可直接用于 RT-PCR 分析的高质量纯净 RNA。通过 RT-PCR 扩增 RNA, 证明包括堆肥、底泥、粪肥等富含有机物的各种类型土壤, 使用此试剂盒均能体现微生物结构完整性。使用 LifeGuard™ Soil Preservation Solution 能在采集用于 RNA 提取的土样后, 运输保存过程中, 保持细菌存活的同时使其与处休眠状态。无论从什么地方采集土样, 抑制 RNase 和 DNase 的活性可保证 cDNA 的全长合成, 以及 16s rRNA profiling。LifeGuard™ 可保持微生物群落结构, -20℃ 30 天, 4℃ 2 星期, 室温 1 星期。室温下保持 RNA 完整性 30 天。我们不建议用 RNALater 或 RNAProtect 保护土壤核酸。

操作预览

土壤微生物多样性的动态性根据微生物群落族群及其新陈代谢状态变化而变化。影响因素有土壤的成分、含水量、日光照射、可利用养分等环境条件。RNA PowerSoil® Total RNA Isolation kit 设计可提取土壤微生物及微动物总 RNA, 包括休眠、正常代谢及死亡的微生物。RNA PowerSoil® Total RNA Isolation kit 可以提供完整的土壤微生物群落结构图及 RNA 成分表。

此试剂盒仅供研究用途, 非诊断用。

相关产品	货号	数量
RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit	12867-25	25 preps
LifeGuard™ Soil Preservation Solution	12868-100	100ml
	12868-1000	1000ml
UltraClean Agarose, Molecular Biology Grade	15003-50	50g
	15003-100	100g
	15003-500	500g
	15003-1000	1kg
UltraClean®PCR Clean-Up Kit	12500-50	50 preps
	12500-100	100 preps
	12500-250	250 preps

新产品! 试用我们的 LifeGuard™ Soil Preservation Solution(MO BIO 货号: 12868-100)

室温下运输或保存土样样品期间保护核酸稳定长达 30 天!



ANBIOSCI TECH LTD

重要提醒：此试剂盒需要用户自备酚/氯仿/异戊醇溶液（25:24:1，pH6.5-8.0）可从 Amresco, Incorporated 或 VWRInternational 公司购买（见“酚/氯仿/异戊醇供应商”名单），或用户自制。

注意：苯酚及酚/氯仿/异戊醇容易被氧化呈现黄色或粉红色，指示该溶液不再适合用于 RNA 提取。使用带颜色的酚/氯仿/异戊醇可能会影响最终 RNA 的质量。使用前存放于干净的容器中，旋紧盖子并避光 4℃ 保存，以延长保质期。

设备要求：

15ml 管离心机（2500g）

微型离心机（13000g）

移液器（20 μl~1000 μl）

移液器（1ml & 10ml）

水浴加热设备（45℃，可选）

Vortex-Genie®2 涡旋仪（MO BIO 货号#13111-V-220）

涡旋仪适配器（MO BIO 货号#13000-V1-15）

需要但不提供的试剂

苯酚：氯仿：异戊醇溶液

试剂盒组分

	货号：12866-25
组分	量
Bead Tubes (with 1.5g beads)	25
Bead Solution	69ml
Solution SR1	7ml
Solution SR2	22ml
Solution SR3	42ml
Solution SR4	165ml
Solution SR5	110ml
Solution SR6	28ml
Solution SR7	3ml
RNA Capture Columns	25
15ml Collection Tubes	100
2.2ml Collection Tubes	25

△实验前请先逐一检查试剂!

购买现成酚氯仿溶液

厂家名称	试剂名称	货号	体积 (ml)
Amresco, Incorporated	Phenol: Chloroform (pH 6.7/8.0) 25:24:1 premixed with isoamyl alcohol	0883-100	100
Amresco, Incorporated	Phenol: Chloroform (pH 6.7/8.0) 25:24:1 premixed with isoamyl alcohol	0883-400	400



VWR International	Phenol: Chloroform premixed with Isoamyl Alcohol 25:24:1	100513-510	100
VWR International	Phenol: Chloroform Buffered Solution 25:24:1	IB05174	400

保存

组分室温（15-30℃）保存。

操作步骤：

1、加入 2g 土壤样品到一个 **Bead Tubes**（试剂盒提供）中。**注意：**参考疑难点关于土样加样量问题。

2、加入 2.5ml **Bead Solution**、0.25ml **SR1 溶液**、0.8ml **SR2 溶液**到 **Bead Tubes**，涡旋混匀。

这一步发生了什么：缓冲液 **Bead Solution** 可分离微生物细胞与土壤成分。**SR1 溶液**含有 **SDS** 以及其它用于细胞裂解的试剂。**SDS** 作为去垢剂，能破坏细胞膜上的脂肪酸、脂质。**SR2 溶液**为沉淀溶液，可去除腐殖质、细胞碎片及蛋白质等非 **DNA** 的有机、无机成分。有机及无机成分的污染会影响到最终 **RNA** 的质量并抑制下游 **RNA** 实验。涡旋振荡是样品均质化和细胞裂解的关键步骤。

注意：温度过低时会产生沉淀。60℃水浴可重溶 **SDS**，并可趁热使用。

3、加入 3.5ml 酚/氯仿/异戊醇溶液（pH6.5-8.0，[用户自备]），涡旋混匀直至分离层消失。

这一步发生了什么：加入酚氯仿可获得最佳裂解效率和得率。裂解的细胞组分留在了有机相，蛋白变性。

4、把 **Bead Tubes** 固定在涡旋仪适配器（货号 13000-V1-15）上，最大转速（3200rpm）涡旋连续振荡 15min。

这一步发生了什么：微生物细胞在 1-3 步化学（裂解缓冲液）和机械（涡旋振荡）力共同作用下崩解。使用 **MO BIO** 的适配器是均质化样品、裂解细胞的最经济方法。你也可以用胶带把 **Tube** 管固定在涡旋仪 3.5 英寸橡胶平板上。不过需要注意的是，胶带会在涡旋振荡过程中会松脱，造成裂解效率下降，样品间结果不统一或得率不高。

5、取下 **Bead Tube**，室温下 2500g 离心 10min。

这一步发生了什么：离心使得相位分离，最终可见三个分离层。最下层含有蛋白、细胞碎片，中间层含有腐殖质及其他有机无机成分，最上层含有总核酸。**注意：**中间层的厚薄决定于样品类型，富含有机质的样品会形成更厚的中间层。

6、小心地把 **Bead Tube** 从离心机取下，转移上分离层（避开中间层及底部分离层）到一个干净的 15ml 收集管中（试剂盒提供）。中间层的厚薄视样品类型而定。**Bead Tube** 中余下的酚/氯仿/异戊醇溶液弃于专用废液回收容器中。注意：富含无机物的土壤，中下分离层可能比较厚实，需要用枪头刺入底部苯酚层。

这一步发生了什么：含有总核酸的上分离层被转移到了一个新的 **Tube** 管中。留下细胞碎片、蛋白质和其它有机成分。注意转移上分离层时避免吸到中间或底层溶液。

7、加入 1.5ml **SR3 溶液**到水相分离层，涡旋混匀。4℃孵育 10 分钟。

这一步发生了什么：第二次使用沉淀剂进一步去除蛋白质、细胞碎片。



8、室温 2500g 离心 10min。避开沉淀小球，转移上清到一个干净的 **15ml 收集管**中（试剂盒提供）。

这一步发生了什么：含有核酸的上层溶液转移到了一个新的 **15ml 收集管**中。剩下非核酸成分。

9、加入 **5ml SR4 溶液**到含有上清液的收集管中，上下颠倒数次或轻轻涡旋混匀。室温孵育 30min。

注意：原来的操作说明是-20℃孵育 30min。若你的土壤类型在-20℃下孵育能获得理想的得率，请按照原方法进行。

10、室温 2500g 离心 30min。

11、轻轻倒掉上清，把 **15ml 收集管**倒扣于一张吸水纸上，停留 5 分钟。

注意：根据土壤类型，底部沉淀可能更大或更黑。

这一步发生了什么：SR4 为 100%异丙醇。核酸形成沉淀后，弃去异丙醇。

12、SR5 使用前先摇匀。加入 **1ml SR5 溶液**到 **15ml 收集管**中。充分重悬沉淀。（**注意：**根据土壤类型，沉淀物有可能难于重悬。可 45℃水浴 10min，再稍微涡旋。重复直至充分重悬沉淀物。）

这一步发生了什么：SR5 为专利的盐溶液，可重悬步骤 14 沉淀下来的核酸。同时平衡 RNA capture column 滤膜，为步骤 16 的冲洗和步骤 20 的洗脱做准备。

13、每个 RNA 样品制备一个 **RNA capture column**（试剂盒提供）：

a. 取下 **RNA capture column**（试剂盒提供）的帽子，把 **RNA capture column** 放入一个 **15ml 收集管**中。Column 悬挂于 **15ml 收集管**中。

b. 加入 **2ml SR5 溶液**到 **RNA capture column** 中，让其自然流下，收集在 **15ml 收集管**中。（**注意：**下一步加样前勿让 column 风干。

14、把步骤 12 获得的 RNA 提取物加到 **RNA capture column** 中，让其自然流下，收集在 **15ml 收集管**中。

15、再加入 **1ml SR5 溶液** 冲洗 **RNA capture column**。让其自然流下，收集在 **15ml 收集管**中。

这一步发生了什么：加到 **RNA capture column** 中的核酸选择性吸附到 column 滤膜上。再加 **1ml SR5** 为了冲洗未被吸附的杂质，准备 RNA 洗脱。

16、把 **RNA capture column** 转移到一个新的 **15 ml 收集管**中（试剂盒提供）。SR6 使用前摇匀。加 **1ml SR6 溶液**到 **RNA capture column** 中洗脱 RNA。让 **SR6** 自然流下收集在 **15ml 收集管**中。

这一步发生了什么：SR6 洗脱缓冲液为专利的盐溶液，可选择性地把 RNA 从 column 滤膜上洗脱下来，留下 DNA、残留的细胞碎片及抑制因子等。**注意：**一款新的试剂盒（货号：12867-25）可把剩余的 DNA 洗脱下来。

17、把洗脱下来的 RNA 转移到一个 **2.2ml 收集管**（试剂盒提供）中。加入 **1ml SR4 溶液**。至少上下颠倒一次混匀。-20℃孵育 10min。

18、室温 13000g 离心 15min，沉淀 RNA。

19、弃去上清，把 **2.2ml 收集管**倒扣在吸水纸上晾干 10min。

这一步发生了什么：SR4 为 100%异丙醇。洗脱的 RNA 沉淀、离心、晾干，然后重悬浓缩。



20、使用 100 μ l SR7 溶液重悬 RNA 沉淀物。

这一步发生了什么：SR7 为 RNase/DNase-Free 水，用于重悬沉淀的 RNA。SR7 不含 EDTA。此时 RNA 可直接用于下游实验。为了延长 RNA 的保存时间，可用 10mM Tris pH8.0 代替 SR7 重悬 RNA。

（注意：对于大多数类型土样，最终 RNA 中携带的 DNA 并不明显。而有机物含量特别高的样品有可能增加 DNA 的污染。对 DNA 污染比较敏感的情况下，可使用经过检测的引物做 PCR 扩增。琼脂凝胶显示有 DNA 条带的话，请参照疑难点中的 DNase 处理。）

LifeGuard™ Soil Preservation Solution 操作说明

1、每克土样加入 2~2.5 倍体积的 LifeGuard™ Soil Preservation Solution。如 1g 土样加入 2~2.5ml LifeGuard™。若采样时直接把土壤加入到 RNA PowerSoil™ 的 15ml Bead Tube，2g 土样分量加 5ml LifeGuard™。

注意：若处理的是沉积物等水分含量较高的样品，每克样品请加入 3 倍体积的 LifeGuard™。

2、涡旋或手动摇匀，使所有土样完全润湿。此时 LifeGuard™ 溶液液面应该高于土样。

3、根据实际条件 -20℃、4℃ 或室温保存样品。提取 RNA 前 2500g 离心 5min，移除 LifeGuard™ 溶液。

4、若直接使用 15ml Bead Tube 收集样品，离心去除 LifeGuard™ 溶液后直接进入 RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit 说明书步骤二继续。

使用 LifeGuard™ 保存的各种类型不同生物量和水分含量土壤已经成功通过测试。沉积物水份含量较高会稀释 LifeGuard™，需要更大的体积比（3:1）。

生物量对在不同温度条件下 LifeGuard 保存微生物群落结构的性能影响很大。对生物量未知或周围环境温度超过一般室温（22-25℃）的情况下，应转移到 -20℃ 或 4℃，或加大 LifeGuard™ 使用比例（>2.5ml LifeGuard/g 土样）。长时间运输或保存土样（超过 30days），请于 -20℃ 保存土样。

疑点难点

土样类型和加样量

最终 RNA 的得率和纯度取决于处理的土样类型。RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit 经过验证适合处理各种类型不同物理、化学、生物特性的土样。高有机物含量的样品，减少加样量至 1g 能更好地平衡 RNA 得率与 DNA 污染。根据我们的经验，对于大多数样品最多加样 2g。

沉积物可稍微多加样，我们曾经最多加样 5g。提取过程中，步骤 12 SR4 使用量可增至与裂解物体积一致（注意计算 SR4 消耗量）。

有些土样或沉积物盐分含量较高，步骤 13 中可见明显的白色或黄色盐沉淀。此沉淀会减少核酸提取得率。为了克服盐沉淀，加入 SR4 后可室温孵育 30min，取代原来的 -20℃ 孵育。其它操作步骤不变。



酚/氯仿/异戊醇液相分离

为了保证酚/氯仿/异戊醇与水相充分分离，步骤 7 要在室温下 2500g 至少离心 10min。离心后，中间层的厚薄视土样有机物含量多寡而不同。转移上清时必须避免吸取中间层及底层。若吸取到了中间层或底层，重新离心已转移的水相层一遍，分离水相层。或往混有苯酚/中间层的水相中加入等体积（2ml）氯仿，上下颠倒数次或涡旋混匀，室温 2500g 离心 10min。转移上层水相，弃去下层苯酚/氯仿层。

SR5 重悬沉淀

高有机物含量的土样获得的 RNA 沉淀可能难于重悬。45℃ 水浴加热 RNA 沉淀有助于重悬。用枪头搅动沉淀或涡旋也能辅助重悬。进入步骤 17 加样到 column 前必须充分重悬 RNA 沉淀。未能充分重悬 RNA 沉淀会减少 RNA 吸附，降低其自然下流的速度，导致 RNA 损失。

Column 冲洗洗脱

RNA Capture Column 中液体只能通过重力流下，不能使用离心机或真空泵抽吸。

使用 RNase-Free DNase 消化 RNA

注意：只有 RNase-Free DNase 才使用于本操作说明。RNases 的存在会消化掉 RNA。

对于绝大多数类型土样，RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit 不存在 DNA 污染。但高有机物含量的土样，仍有可能提取 RNA 的同时带有 DNA 污染。请把下文操作说明与 DNase 生产厂家的说明书结合，处理 RNA。

- 若一次处理 RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit 得到的所有 RNA，加入 4 单位的 DNase，加入适当的 DNase 缓冲液和水，定容至 200 μl。通常 10X DNase 消化缓冲液为含 10mM CaCl₂、10mM MgCl₂ 的 10mM Tris-HCl 缓冲液，pH7.5。
- 37℃ 孵育 30-45min。
- 计入 200 μl 酚/氯仿/异丙醇（pH6.5-8.0），涡旋混匀。室温孵育 5min
- 10000g 离心 5min。
- 小心转移上层液相到另一 Tube 管中。
- 加入 1/10 体积的 5M NaCl，2 倍体积的 100%乙醇，上下颠倒混匀。
- 20℃ 孵育 30min，10000g 离心 10min。
- 弃去上清，晾干沉淀小球。
- 使用与沉淀一样体积的 SR7 重悬小球。此时 RNA 可不用稀释直接用于 RT-PCR 等下游实验。

更多实用技巧请参阅 <http://www.anbiosci.com/MBweibo/blog.htm>