

## AllPure Environmental DNA and RNA Kit

环境样品 RNA/DNA 共提试剂盒

### 产品简介

本产品采用珠磨法和硅胶柱纯化技术，可快速安全地从土壤样品、粪便样品、环境样品、水体样品中同时提取得到RNA和DNA。整个提取过程只需50分钟。本产品适合于从≤500mg土壤样品、≤200mg粪便样品、水体滤膜、底泥或发酵液残渣中同时提取得到RNA和DNA。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。得到的DNA可直接用于PCR、Southern Blo等实验。

### 产品组份

产品编号	R511701B	R511702B	R5117-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
2ml Beads Tubes	10 个	50 个	250 个
Buffer STL	10 ml	40 ml	180 ml
Buffer SL	3 ml	15 ml	60 ml
Buffer PCI	1.5 ml	7 ml	30 ml
Buffer GXP	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer GWP	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer RVV1	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer RVV2	10 ml	50 ml	3 x 50 ml
Nuclease Free Water	1.8 ml	15 ml	50 ml
说明书	1	1	1

## 保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 18 个月。

## 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 在 Buffer GW1 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。

## 实验步骤

1. 在 2ml Bead Tubes 中，加入~0.5g 土壤、0.1~0.2g 粪便、0.3~0.5g 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 600µl Buffer STL 和 100µl 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 SOL 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。

采用珠磨机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 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，12,000 × g 离心 5 分钟。
  5. 转移上清液 (~550µl) 至新的离心管中，加 200µl Buffer SL，涡旋混匀 5 秒。12,000 × g 离心 5 分钟。
  6. 转移上清液至新的离心管中，加入 700µl 结合液 GXP，颠倒 6-8 次。

#### 吸附 DNA:

7. 把 HiPure DNA Mini Column 装在 2ml 收集管中，把一半体积的混合液转移至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟，把滤液转移至 5ml 离心管中。
8. 把 DNA 柱子装回收集管中，转移剩余的混合液至柱子，10,000 × g 离心 1 分钟。把滤液再转移至 5ml 离心管中，合并两次的滤液，按第 16 步进行 RNA 提取。
9. 把 DNA 柱子装回收集管中，加入 500µl Buffer GWP 至柱子中，10,000 × g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500µl Buffer RW2 至柱子。12,000 × g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500µl Buffer RW2 至柱子。12,000 × g 离心 1 分钟。
12. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。
13. 将 DNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 30~50µl 预热至 65°C Nuclease Free Water 至柱子的膜中央，室温静置 5 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
14. 再加入 30~50µl 预热至 65°C Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 5 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
15. 弃去 DNA 柱，把 DNA 保存于 2~8°C 或 -20°C。

## 过柱纯化 RNA

16. 取第 7-8 步获得的滤液，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，颠倒混匀 6-8 次。
17. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移  $\leq 700\mu\text{l}$  混合液至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
18. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
重复这一步直至全部混合液都转移至柱子并离心。
19. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 $\mu\text{l}$  Buffer RW1 至柱子。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
20. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 $\mu\text{l}$  Buffer RW2 至柱子。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
21. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500 $\mu\text{l}$  Buffer RW2 至柱子。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
22. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
23. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30-100 $\mu\text{l}$  Nuclease Free Water 至柱子膜中央，室温静置 2 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C。