

CAT#: GZ0120103-50



细菌 RNA 提取试剂盒

Bacteria RNA Purification Kit

(离心柱型)

使用手册 V1.0

北生京泽（启东）生物科技有限公司
江苏省南通市启东市启东经济开发区林洋路 500 号
网址：www.bsgeneze.com；电话：40001-59600

产品及特点

本试剂盒在无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，通过基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后裂解混合物通过一个基因组 DNA 清除柱，基因组 DNA 被清除而 RNA 穿透滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

它具有下列特点：

1. 安全，完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 稳定：多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.9-2.0，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

适用范围：

适用于快速提取细菌总 RNA，可有效清除 gDNA 残留，不需要使用 DNase 消化，RNA 可直接用于反转录 PCR，荧光定量 PCR。

成分规格

产品组成	GZ0120103-50
TE (pH8.0)	6mL
溶菌酶	20mg
Buffer RLT Plus	25mL
Buffer RW1	40mL
Buffer RW	10mL 第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇
70%乙醇	9mL RNase-free H ₂ O 第一次使用前加入 21 mL 无水乙醇
RNase-free H ₂ O	10mL
基因组 DNA 清除柱 和收集管	50 套
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	50 套

运输及保存

室温储存 12 个月不影响使用效果。溶菌酶储存于 4℃。

储存事项：

1. 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温（4℃ 或者 -20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃-25℃）进行。
3. 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。

使用方法

自备试剂

无水乙醇。

提示（实验前请先阅读注意事项）

- 第一次使用前请先在 Buffer RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇！充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- 提取细菌 RNA 需先配制加了溶菌酶的 TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0)，TE 中溶菌酶的终浓度为 1mg/ml。

1. 离心收集 1-2ml 菌液(约 10^8 - 10^9 细胞)到一个 1.5ml 离心管，尽可能去除上清，注意残留的上清不能超过 20 μ l/每使用 100 μ l TE（见步骤 2）。
2. 根据细胞的种类和数量,充分重悬细胞在 100 μ l(< 5×10^8 细胞)/200 μ l(5×10^8 - 7.5×10^8 细胞)TE 中（TE 中需先加入溶菌酶，终浓度为 1mg/ml）或者直接用 TE 重悬后，用干净吸头挑取少许溶菌酶加入。

3. 室温(15-25 $^{\circ}$ C)温育 5 分钟/溶菌酶，破解细胞壁。每 2 分钟涡旋振荡 10 秒帮助破壁。
(注意：各种细菌破壁的难易程度不一样，一般革兰氏阴性菌 E.coli 使用上面的条件就足够了,甚至可以省略该步骤，但是某些革兰氏阳性菌如 B. subtilis 难破壁需要提高溶菌酶浓度到 15mg/ml 和温育时间到 10 分钟。如果金黄色葡萄球菌需要加入 lysostaphin 到 1mg/ml，37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。总之不同细菌类型破壁难易程度不同，有的难破壁的种类需要根据用户自己的具体情况调节酶的种类、工作浓度和温育温度、时间，此外还可以联合使用玻璃珠击打，机械破壁，蛋白酶 K 消化等方法帮助破壁。)

4. 短暂离心收集细胞到管底，吸弃上清。涡旋振荡重悬分散细胞。

5. 加入 500 μ l Buffer RLT Plus，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。

(注意：一般加入裂解液后充分涡旋吹打后应该见不到明显团块或者不溶物,极少数情况下如果有明显团块或者不溶物可以将裂解物 13,000rpm 离心 3 分钟,沉淀不能裂解的碎片或者不溶物,将裂解物上清全部转到一个新的离心管再进行下一步。)

6. 立刻将裂解物加入一个 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）13,000 rpm 离心 30 秒，保留滤过液（RNA 在滤过液中）。

(注意：确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。)

7. 用微量移液器较精确估计滤过液体积（通常为 500 μ l，滤过时候损失体积应该减去），加入等体积的 70%乙醇（请先检查是否已加入无水乙醇!），此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程,立即吹打混匀,不要离心。。

8. 立刻将混合物(每次小于 700 μ l,多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中,(吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 30 秒,弃掉废液。
9. 加 700 μ l Buffer RW1, 室温放置 30 秒, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
10. 加入 500 μ l Buffer RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 13,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。加入 500 μ l Buffer RW,重复一遍。
11. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液,以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
12. 取出吸附柱 RA, 放入一个 RNase free 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l RNase free H₂O, 室温放置 1 分钟, 13,000 rpm 离心 1 分钟。
(注意: 洗脱体积应不少于 30 μ l, 体积过小影响回收效率。如果需要得到更大浓度的 RNA, 将离心得到的 RNA 溶液加回到吸附柱重复洗脱一遍。)

注意事项:

- 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机,
- 样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 处理能力, 否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时, 如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时宁可使用较少的样品处理量, 将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
- Buffer RLT Plus 和 Buffer RW1 中含有刺激性化合物, 操作时戴乳胶手套, 避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- 关于 DNA 的微量残留:

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留 (DNase 消化也无法做到 100%无残留), 本试剂盒可以做到绝大多数 DNA 已经被清除, 不需要 DNase 消化, 可直接用于反转录 PCR 和荧光定量 PCR。个别特殊情况如 DNA 含量过于丰富造成残留或者要进行严格的 mRNA 表达量分析荧光定量 PCR, 我们建议在进行模板和引物的选择时:

- 1) 选用跨内含子的引物,以穿过 mRNA 中的连接区,这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
- 2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
- 3) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(cleanup)。
- 4) 在步骤 Buffer RW1 漂洗前, 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。
- 5) RNA 纯度及浓度检测:

完整性: RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳(电泳条件: 胶浓度 1.2%; 0.5 $\times$ TBE 电泳缓冲液; 150v, 15 分钟)检测完整性。由于细菌中 70%-80%的 RNA 为 rRNA, 电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。细菌 rRNA 大小分别约为 5 kb 和 2kb, 分别相当于 26S 和 16S rRNA。细菌 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍, 否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片

状或条带消失表明样品严重降解。

纯度：OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的参考指标。高质量的 RNA，OD260/OD280 读数在 2.1-2.2 之间（100% 纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右，很多公司无法达到这个标准，所以 1.9-2.0 就凑合用了，但是我们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2）。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品，假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280 读数 1.8-2.1 之间，在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间，但这并不表示 RNA 不纯。

浓度：取一定量的 RNA 提取物，用 RNase-free 水稀释 n 倍，用 RNase-free 水将分光光度计调零，取稀释液进行 OD260, OD280 测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度（ng/μl）
$$=(OD260) \times (\text{稀释倍数 } n) \times 40$$

关联产品

产品编号	产品名称
GZ080501	RNAlocker 非冻型血液 RNA 保存液
GZ080502	RNAlocker 非冻型组织 RNA 保存液
GZ0733140	RNA 高灵敏度测定试剂盒
GZ0123070-100	总 RNA 提取试剂（TRIzol）



关注京泽微信公众号
了解更多产品资讯