

细菌 RNA 快速提取试剂盒

KR015 50次

试剂盒组成、储存、稳定性:

| | | |
|-----------------------------|-----|--|
| 试剂盒组成 | 保存 | 50 次 |
| TE (PH8.0) | 室温 | 6ml |
| 溶菌酶 | 4°C | 20mg |
| 裂解液 RLT Plus | 室温 | 25ml |
| 去蛋白液 RW1 | 室温 | 40 ml |
| 漂洗液 RW | 室温 | 10ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇 |
| 70%乙醇 | 室温 | 9ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前按说明加指定量乙醇 |
| RNase-free H ₂ O | 室温 | 10 ml |
| 基因组 DNA 清除柱和收集管 | 室温 | 50 套 |
| RNase-free 吸附柱 RA 和收集管 | 室温 | 50 套 |

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 溶液应该都是澄清的。如果环境温度低, 溶液形成沉淀, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 不合适的储存比如低温 (4°C 或者 - 20°C) 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°C - 25°C) 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。

产品介绍:

试剂盒采用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 用乙醇调节结合等条件后, RNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 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。

产品特点:

1. 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. 新型基因组 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。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.0~2.2, 基本无 DNA 残留, 可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

注意事项

1. **所有的离心步骤均在室温完成**, 使用转速可以达到 13,000 rpm 的台式离心机即可。
2. **样品处理量不要超过基因组吸附柱 DNA 和 RNA 吸附柱 RA 处理能力, 否则造成 DNA 残留或者产量降低。**所以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。
3. 裂解液 RLT Plus 和去蛋白液 RW1 中含有盐酸胍/异硫氰酸胍化合物, 操作时要戴乳胶手套, **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。**
4. 预防 RNase 污染, 应注意以下几方面:
 - 1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌, 可能导致 RNase 污染。
 - 2) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - 3) RNA 在裂解液 RLT Plus 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150°C 烘烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟, 然后用水彻底清洗,

再灭菌, 即可去除RNase。

4) 配制溶液应使用无 RNase 的水。(将水加入到干净的玻璃瓶中, 加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v), 37°C 放置过夜, 高压灭菌。)

5. 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), 本公司的产品, 由于采取了独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术, 绝大多数 DNA 已经被清除, 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, 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 处理以提高效果。
- 4) 去蛋白液 RW1 漂洗前, 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。

6. 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×TBE 电泳缓冲液; 150v, 15 分钟) 检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA, 电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。动物 rRNA 大小分别约为 2 kb 和 1kb, 分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍, 否则提示 RNA 样品的降解。出现小的弥散片状或条带消失表明样品严重降解。但是应该注意区分是提取出来的 RNA 样品本身降解了, 还是提取出来的 RNA 是完好的, 只是在电泳过程中降解的。

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 (100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右, 很多公司的产品因为残留蛋白或者 DNA 较多, 造成比值降低, 无法达到 2.2 这个纯度标准。OD260/OD280 读数受测量使用的机器影响, 也受测定所用稀释溶液的 pH 值影响。微量分光光度计一般不需要稀释, 不受稀释溶液的 PH 值影响。但是同一个 RNA 样品, 如果测量的时候机器要求稀释后测量, 假定在 10mM Tris, pH7.5 稀释溶液

中测出的 OD260/OD280 读数 1.9-2.1 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) × (稀释倍数 n) × 40。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇!
 - ⇒ 提取细菌 RNA 需先配制加了溶菌酶的 TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA),
 - ⇒ 溶菌酶的 TE 浓度为 1mg/ml (即称取 6 毫克溶菌酶加入到 6 毫升 TE 溶液中)
1. 离心收集 1-2ml 菌液(10^8 - 10^9 细胞)到一个 1.5 ml 离心管, 尽可能去除上清。(上清不能超过 20 微升) 根据细胞的种类和数量, 在离心管中加入 100μl(5×10^8 细胞)或者 200μl(5×10^8 - 7.5×10^8 细胞) TE 中(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), TE 中已加入溶菌酶, 浓度为 1mg/ml。

2. 室温(15-25°C)温育 5-10 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, 甚至可能省略该步骤, 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 (需要自己配置) 到 1mg/ml, 37°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。

3. 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。
4. 加入 500μl 裂解液 RLT Plus, 吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。

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离心管再进行下一步。

5. 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)。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。
6. 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。
7. 立刻将混合物(每次小于 700 μ l, 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。
8. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 秒, 13, 000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
9. 加入 500 μ l 漂洗液 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。
10. 重复步骤 9 一次
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 water, 室温放置 1 分钟, 13,000 rpm 离心 1 分钟。
13. 如果预期 RNA 产量>30 μ g, 加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 10, 合并两次洗脱液, 或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高, 分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%, 但是浓度要低, 用户根据需要选择。