



武汉科尔普生物科技有限公司

Keep Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ EASYspin Plus 细菌 RNA 快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 RN43
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

EASYspin 细菌 RNA 快速提取试剂盒

目录号: RN43

| 目录编号 | 包装单位 |
|--------|------|
| RN4302 | 50次 |

❖ 适用范围:

适用于快速提取细菌总RNA, 使用独有基因组DNA清除柱技术确保有效清除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。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

| 试剂盒组成 | 保存 | 50 次 |
|-----------------------------|----|---|
| TE (PH8.0) | 室温 | 6 ml |
| 溶菌酶 | 4℃ | 20 mg |
| 裂解液 RLT Plus | 室温 | 25 ml |
| 去蛋白液 RW1 | 室温 | 40 ml |
| 漂洗液 RW | 室温 | 10ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i> |
| 70%乙醇 | 室温 | 9ml RNase-free H ₂ O <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i> |
| 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. 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。

❖ **产品介绍:**

本公司推出 EASYspin 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上, 又独家研发成功基因组 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 在高离子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。

❖ **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. 独家研发成功基因组 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的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 所样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱DA和和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。
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. 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，本公司的 EASYspin Plus 系列 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留（一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见）影响不是很大，如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR，我们建议在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。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(cleanup)，请联系我们索取具体操作说明书。

4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。请联系我们索取具体操作说明书（艾德莱 DNA 酶柱上消化试剂盒货号：RN34）。

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 13S 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（10mMTris, pH7.5）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/ μ l）= (OD260) \times （稀释倍数 n） \times 40。

❖ **操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

提示：

⇒ 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或者 lysostaphin 的 TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM

EDTA), TE 中已加入溶菌酶或者 lysostaphin, 浓度为 1mg/ml。

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, 注意残留的上清不能超过 20 μ l/每使用 100 μ l TE(见下面步骤 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(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), TE 中已加入溶菌酶或者 lysostaphin, 浓度为 1mg/ml, 或者直接用 TE 重悬后, 用干净枪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, 或者 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟/ lysostaphin, 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 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 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。

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)。

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 去蛋白液 RW1，室温放置 30 秒，13, 000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
 10. 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。加入 500 μ l 漂洗液 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 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。裂解液 RLT Plus。最大处理量不超过 10^7 个细胞。