

AipEasy 细菌 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)

AipEasy Bacterial RNA Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆目录号：RE260

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(RE260-01)
TE (PH8.0)	室温	6mL
溶菌酶	4°C	20mg
裂解液 RLT	室温	50mL
去蛋白液 RW1	室温	40mL
漂洗液 RW	室温	10mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	50 套

◆适用范围：适用于快速提取细菌总RNA。

◆产品储存：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°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温(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：独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后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 Water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

◆产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
4. 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 和 Northern-blot 等各种下游实验。

◆注意事项：

1. 所第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
2. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
3. 需要自备乙醇。
4. 裂解液 RLT 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。
5. 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 RNase-free 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - 3) RNA 在裂解液 RLT 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用 RNase-free 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150℃ 烘烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5M 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 RNase-free 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℃ 放置过夜，高压灭菌。)
6. 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 AipEasy 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。本试剂盒还可以用于

DNase I 处理后的 RNA 清洁(Clean up)，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(爱普科学 DNA 酶柱上消化试剂盒货号：RE280)。

7. 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 5kb 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(10mM Tris, 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 和 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)：

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(10mM Tris-HCl, 1mM 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(10⁸-10⁹ 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 20μL/每使用 100μL 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 100μL(5×10⁸ 细胞)/200 μL(5×10⁸-7.5×10⁸ 细胞)TE 中(10mM Tris-HCl, 1mM 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℃)温育 5 分钟/溶菌酶，或者 37℃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 各种细菌破壁的难易程度不一样，一般革兰氏阴性菌使用上面的条件就足够了，甚至可能省略该步骤，但是某些阳性难破壁需要提高溶菌酶浓度或者使用 Lysostaphin，玻璃珠机械破壁，蛋白酶 K 消化或者联合使用等方法，需要根据用户

自己的具体情况调节酶的工作浓度和温育温度、时间和选择正确的方法。

4. 加入 350 μ L(如果上面使用 100 μ L TE/酶)或者 700 μ L(如果上面使用 200 μ L TE/酶)裂解液 RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。

注：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. 加入 250 μ L 无水乙醇(曾加入 100 μ L TE/350 μ L RLT 管)或者 500 μ L 无水乙醇(曾加入 200 μ L TE/700 μ L RLT 管)，立即吹打混匀。
6. 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)13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
7. 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。

注：如果 DNA 残留明显，可在加入 RW1 后室温放置 5 分钟再离心。

8. 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。
9. 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。
10. 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。
11. 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)。

注 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，用户根据需要进行选择。裂解液 RLT Plus。最大处理量不超过 10^7 个细胞。

