

AipPure 细菌(RNA/DNA)分离提取试剂盒(离心柱型)

AipPure Bacterial (DNA/RNA) Isolation and Extraction Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

- ◆版本号：241110
- ◆目录号：RE801
- ◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(RE800-01)
裂解液 RLT Plus	室温	50mL
溶菌酶	4°C	20mg
TE 溶液(PH8.0)	室温	10mL
抑制物去除液 IR	室温	25mL
去蛋白液 RW1	室温	40mL
70%乙醇 (RNase-free Water)	室温	9mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 RW	室温	10mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 WB	室温	15mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	10mL
RNase-free Water	室温	10mL
基因组 DNA 吸附柱 和收集管	室温	50 套
RNA 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

◆适用范围：适用于快速从同一个细菌样本中同时分离提取基因组DNA和总RNA。

◆产品储存：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。常温组分储存于低温(4°C或-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(15-25°C)进行。

◆产品介绍：

本试剂盒适用于快速从同一个细菌样本中同时分离提取基因组 DNA 和总 RNA。采用爱普科学独特的裂解液，可迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA/DNA 酶，然后裂解混合物 DNA/RNA 同时通过一个基因组 DNA 吸附柱，基因组 DNA 被吸附而 RNA 穿透滤过。DNA 吸附柱上的基因组 DNA 经过一系列漂洗/离心等步骤，洗脱得到纯净基因

组 DNA。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 RNA 吸附柱上，再通过一系列快速的漂洗/离心等步骤，洗脱得到纯净的 RNA。

本试剂盒在爱普科学独家推出的无苯酚、氯仿 DNA/RNA 快速提取技术基础上，又配合爱普科学独特的分离纯化技术，同时得到的基因组 DNA 和 RNA 纯度高、完整性好、且互不干扰。得到的高纯度基因组 DNA 和 RNA 可直接用于 PCR、反转录 PCR、荧光定量 PCR、Southern、Northern-Blot、酶切、测序等相关分子生物学实验。

◆产品特点：

1. 操作安全，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，单个样品基因组 DNA/RNA 分离提取操作一般可在 50 分钟内完成。
3. 爱普科学独家研发的基因组 DNA 清除柱技术确保高效清除 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，得到的基因组 DNA/RNA 纯度高、完整性好。

◆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 13,000rpm 的传统台式离心机。
2. 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。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。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组 DNA 吸附柱和 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。
4. 裂解液 RLT Plus、抑制物去除液 IR、去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，操作时请穿实验服并佩戴一次性乳胶手套，实验操作中应避免避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要立即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°C 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°C 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(DNase 消化也无法做到 100%无残留), 本公司的 RNA 提取产品, 由于采取了本公司独特的缓冲体系和特殊吸附能力的吸附膜, 已经清除了绝大部分的 DNA 残留, 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 中的连接区, 这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。或者选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。或者缩短延伸时间, 使 DNA 来源模板无法参与扩增反应。
 - 2) 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 清洁纯化(货号: RE182), 请联系我们索取具体操作说明书。
 - 3) 在操作步骤的去蛋白液 RW1 漂洗前, 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 柱上消化处理, 以进一步清除 gDNA 残留污染。可购买爱普科学的 DNA 酶柱上消化试剂盒(货号: RE180), 购买前可先索取具体操作说明书。
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。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重要参考指标。高质量 RNA 的 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, 因此降低要求 1.9-2.0 就凑合使用了, 但是爱普科学的试剂盒提取产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准)。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 读数在 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 和 OD₂₈₀ 测定, 按照以下公式进行 RNA 浓度的计算:

终浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)=(OD_{260}) \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、漂洗液 WB 和 70%乙醇瓶中按照该组分标签上的指示,加入指定量无水乙醇,充分混匀后请及时在标签上标记,以免多次加入!

提取细菌样本 RNA 需先配制已加入溶菌酶(Lysostaphin)的 TE/酶工作液,确定 TE 溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)中已加入溶菌酶(Lysostaphin),浓度为 1mg/mL,备用。

1. 离心收集 1-2mL 菌液(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 μL /每使用 100 μL TE/酶工作液。
2. 根据细胞的种类和数量,充分重悬细胞在 100 μL (5×10^8 细胞)或 200 μL (5×10^8 - 7.5×10^8 细胞)的 TE/酶工作液中。

注: 也可以直接用 TE 溶液重悬后,用干净枪头挑取少许溶菌酶加入。

3. 室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$)温育 5 分钟(溶菌酶),或者 37 $^{\circ}\text{C}$ 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: 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 $^{\circ}\text{C}$ 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、温育温度和时间,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,吸弃上清后,涡旋振荡重悬分散细胞。
5. 加入 500 μL 裂解液 RLT Plus,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。

6. 立刻将裂解物加入一个基因组 DNA 清除柱上(清除柱放在收集管内), 13,000rpm 离心 30 秒,保留滤过液(RNA 在滤过液中)。DNA 吸附柱子(膜上吸附有基因组 DNA)短时间可存放 4 $^{\circ}\text{C}$ 度备用。

注 确保离心后液体全部滤过,膜上无残留,如有必要,可加大离心力和离心时间。

以下步骤为提取 RNA 步骤:

7. 用微量移液器较精确估计滤过液体积(通常为 500 μL ,滤过时损失的体积应该减去),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)13,000rpm 离心30秒，弃废液。
9. 加入700 μ L去蛋白液RW1，室温放置30秒，13,000rpm 离心30秒，弃废液。
10. 加入500 μ L漂洗液RW(请先检查是否已加入无水乙醇!)，13,000rpm 离心30秒，弃废液。再加入500 μ L漂洗液RW，重复操作一遍，弃废液。
11. 将吸附柱RA放回空收集管中，13,000rpm 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，放入一个新的无酶的1.5mL离心管中，根据预期RNA产量在吸附膜的中间部位加入30-50 μ L RNase-free Water(事先在70-90 $^{\circ}$ C水浴中加热可提高产量)，室温放置1分钟，13,000rpm 离心1分钟，洗脱RNA。提取的高纯度RNA可直接用于下游相关实验或储存于-85 $^{\circ}$ C至-65 $^{\circ}$ C保存。

注 如果预期RNA产量>30 μ g，可重新加入30-50 μ L RNase-free Water重复操作步骤12一遍，合并两次洗脱液(如果需要RNA产量高)；或者使用第一次的洗脱液重新加回到吸附柱内，重新洗脱一遍(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，用户根据具体实验需要自行选择。

注 洗脱体积越大，洗脱效率越高，RNA产量越高，但是浓度将会降低。如果需要RNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小洗脱体积建议最好不少于25 μ L，体积过小会降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。

以下步骤为提取 DNA 步骤：

13. 在操作步骤6的DNA吸附柱上加入500 μ L抑制物去除液IR，12,000rpm 离心30秒，弃废液。
14. 加入700 μ L漂洗液WB(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000rpm 离心30秒，弃废液。再加入500 μ L漂洗液WB，重复操作一遍，弃废液。
15. 将DNA吸附柱放回空收集管中，12,000rpm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。
16. 取出DNA吸附柱，放入一个新的无酶的1.5mL离心管中，根据预期DNA产量在吸附膜的中间部位加入100 μ L洗脱缓冲液EB(洗脱缓冲液事先在65-70 $^{\circ}$ C水浴中预热效果更好)，室温放置3-5分钟，12,000rpm 离心1分钟，收集得到的DNA。DNA可以存放在-20 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在-70 $^{\circ}$ C保存。

注：可将第一次得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置2分钟，12,000rpm离

心1分钟，可以提高10%左右的浓度。

注：洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但最小体积不应少于 50 μ L，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

=====

