

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：260110
- ◆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	13mL 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	5mL
基因组 DNA 吸附柱 和收集管(2mL)	室温	50 套
RNA 吸附柱 RA 和收集管(2mL)	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

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(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、漂洗液 WB 和 70%乙醇瓶中按照该组分标
官网查询：www.ipresci.com

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 μ L/每使用100 μ L TE/酶工作液。
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)或200 μ L(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 $^{\circ}$ C)温育5 min(溶菌酶)，或者37 $^{\circ}$ C温育15 min(Lysostaphin)，破解细胞壁。每2 min涡旋振荡10 sec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 min。如果金黄色葡萄球菌需要加入 Lysostaphin 到 1mg/mL，37 $^{\circ}$ C温育 15 min。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 μ L裂解液RLT Plus，吹打混匀后用手剧烈振荡20 sec，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 min，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. 立刻将裂解物加入到一个基因组DNA吸附柱中(吸附柱已放入收集管中)，13,000rpm 离心30 sec，保留滤过液(RNA在滤过液中)。基因组DNA吸附柱(膜上吸附有基因组DNA)，短时间可存放4 $^{\circ}$ 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 μ L，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)加入到一个吸附柱RA中(吸附柱已放入收集管中)，13,000rpm 离心30 sec，弃滤液。

注：装滤过液体和乙醇混合物的基因组DNA吸附柱的收集管(混合物转入RNA吸附

柱后剩下的空收集管需要保留，将基因组DNA吸附柱放回此收集管保留在4°C，备用用于操作步骤13开始的基因组DNA提取。

- 加入700μL去蛋白液RW1，室温放置30 sec，13,000rpm 离心30 sec，弃滤液。
- 加入500μL漂洗液RW(请先检查是否已加入无水乙醇!)，13,000rpm 离心30 sec，弃滤液。再加入500μL漂洗液RW，重复操作一遍，弃滤液。
- 将吸附柱RA放回空收集管中，13,000rpm 离心2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
- 取出吸附柱RA，放入一个新的RNase-free离心管中，根据预期RNA产量在吸附膜的中间部位加入30-50μL RNase-free Water(事先在70-90°C水浴中加热可提高产量)，室温放置1 min，13,000rpm 离心1 min，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°C至-65°C保存。

注 如果预期RNA产量>30μg，可重新加入30-50uL 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25uL，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：

- 在操作步骤6保存的基因组DNA吸附柱上加入500μL抑制物去除液IR，13,000rpm 离心30 sec，弃滤液。
- 加入700μL漂洗液WB(请先检查是否已加入无水乙醇!)，13,000rpm 离心30 sec，弃滤液。再加入500μL漂洗液WB，重复操作一遍，弃滤液。
- 将基因组DNA吸附柱放回空收集管中，13,000rpm 离心2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
- 取出基因组DNA吸附柱，放入一个新的RNase-free离心管中，根据预期DNA产量在吸附膜的中间部位加入100μL洗脱缓冲液EB(洗脱缓冲液事先在65-70°C水浴中预热效果更好)，室温放置3-5 min，13,000rpm 离心1 min，收集得到的DNA。DNA可以存放在-20°C，如果要长时间存放，可以放置在-70°C保存。

注：可将第一次得到的溶液重新加入基因组DNA吸附柱中，室温放置2 min，13,000rpm 离心1 min，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。

=====

