

细菌总 RNA 快速提取试剂盒

货号: NG322S 50次
NG322M 100次

试剂盒组成	50 次	100 次
溶菌酶 (4°C)	20mg	40mg
裂解液 RL (4°C避光)	50 ml	100ml
去蛋白液 RE	25 ml	50ml
漂洗液 RW	10 ml	25ml
	第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	10 ml	20ml
RNase-free 吸附柱 RA	50 个	100 个
收集管 (2ml)	50 个	100 个

储存事项:

1. 运输和储存均在室温下 (15°C - 25°C) 进行。裂解液 RL 可以常温运输, 收到后 **4°C避光可长期保存, 常温保存 3 个月也不影响使用质量。**
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。

产品介绍:

改进的异硫氰酸胍/酚一步法 (NGzol 法) 裂解细胞和灭活 RNA 酶, 然后总 RNA 在高离序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特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好, 纯度高和离心柱方便快捷的优点, 不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程, RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的 RL 裂解液配方, 可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程, 提取 RNA 纯度更高。
5. 有效的去除了 5S 在总 RNA 中含量, 提高了纯度。

注意事项

1. **第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入指定量乙醇, 加入后请及时打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入!**
2. 本试剂盒抑制RNA酶效果极佳, 所有离心步骤如未加说明, 均可在常温进行。
3. 裂解液RL和去蛋白液RE中含有刺激性有害化合物, 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. 考虑到环保问题, 本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿, 使用前需要自备氯仿。
5. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析RNA的质量。好的RNA产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体RNA带, 分别为~5Kb (28S), ~2Kb (18S), 条带亮度比值约为2: 1。有时候也可以看到~0.1kb和0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到4, 5条带也属于正常现象, 如果RNA未成熟的前体或者不均一核RNA、小核RNA提取出来也可能看到介于7Kb和15Kb之间的不连续的高分子量条带。
6. 检测OD₂₆₀/OD₂₈₀吸光度比值时, 如需稀释RNA样品应该用TE (PH 8), 如果用水稀释后检测, 由于一般水离子强度和PH值低, 会使OD₂₈₀升高, 从而使比值降低。
7. 加入裂解液RL匀浆后, 加氯仿前, 样品可在 -60°C-70°C 保存一个月以上。

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 PH8.0), (自备) TE 中溶菌酶的终浓度为 1mg/ml。

1. 离心收集 1-2ml 菌液(约 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。
2. 根据细胞的种类和数量,充分重悬细胞在 100 μ l($<5 \times 10^8$ 细胞)/ 200 μ l(5×10^8 - 7.5×10^8 细胞) TE 中 (TE 中需先加入溶菌酶, 终浓度为 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, 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 i 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. s 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 n lysostaphin 到 1mg/ml，37 $^{\circ}$ C 温育 5- 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1 ml 的裂解液RL后匀浆。组织样品容积不能超过RL容积的10%。将匀浆样品剧烈震荡混匀, 在15 -30 $^{\circ}$ C条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。

可选步骤：4 $^{\circ}$ C 12,000 rpm 离心10 min, 小心取上清转入一个新的RNase free的离心管中。当样品富含蛋白质、脂肪、多糖或是细胞外物质例如肌肉、脂肪组织或植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在2~8 $^{\circ}$ C 12,000 rpm 离心10 min, 移除匀浆中不溶解的物质, 余下的沉淀中包含有细胞外膜、多糖、以及高分子量DNA, 而上层的超浮游物含有RNA。

6. 每1 ml RL加0.2 ml 氯仿。盖紧样品管盖, 剧烈振荡15 sec并将其在室温下孵育3 min。
7. 于4 $^{\circ}$ C 12,000 rpm 离心10 min, 样品会分成三层: 下层有机相, 中间层和上层无色的水相, RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加RL体积的50%, 把水相小心转移到新管中 (不要触碰中间层), 记录水相体积。
8. 加入水相体积一半也就是0.5倍体积的无水乙醇, 混匀 (此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱RA中 (吸附柱套在收集管内, 若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱RA中, 请分两次转入吸附柱RA中。), 12,000 rpm 离心45 sec, 弃废液, 将吸附柱重新套回收集管。
9. 加 500 μ l 去蛋白液 RE, 12,000 rpm 离心 45 sec, 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!), 12,000 rpm 离心45 sec, 弃废液。
11. 重复步骤8一次。
12. 将吸附柱RA放回空收集管中, 13,000 rpm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。
13. 取出吸附柱RA, 放入新RNase free离心管中, 根据预期RNA产量在吸附膜的中间部位加50-80 μ l RNase free water, 室温放置2 min, 12,000 rpm 离心1 min。如果需要较多RNA, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心1 min, 或者另外再加30 μ l RNase free water, 离心1 min, 合并两次洗脱液。

洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 RNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积最好不少于 30 μ l, 体积过小降低 RNA 洗脱效率, 减少 RNA 产量。