DiSpin 细菌 RNA 快速提取试剂盒

货号：DP225-01

规格：50 次

保存：15-25℃

【产品简介】

本产品适用于快速提取细菌总 RNA，在 DiSpin 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，又增加了基因组 DNA 清除柱，以便有效清除 gDNA，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于 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，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和离心的步骤, 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。

【产品组分】

货号	组分	体积
DP225-101	裂解液 RLT Plus	25 ml
DP225-102	去蛋白液 RW1	40 ml
DP225-103	漂洗液 RW（首次使用前加入 42ml 无水乙醇）	10 ml
DP225-104	RNase-free Water	10 ml
DP225-105	70%乙醇（首次使用前加入 21ml 无水乙醇配成 **70%乙醇**）	9 ml
DP225-106	TE (PH8.0)	6 ml
DP225-107	溶菌酶	20 mg
DP225-108	吸附柱 RA 和收集管（RNase-free）	50 套
DP225-109	基因组 DNA 清除柱和收集管	50 套

【保存条件】

室温保存，保质期一年。

【产品特点】

1. 不需要使用苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。

2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。

3. 独有的基因组 DNA 清除柱确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。

4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD_{260}/OD_{280} 比值达 2.1-2.2，基本无 DNA 残留,可用于 RT-PCR，Northern-blot 等实验。

【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的离心机。

2. 样品处理量不能超过基因组DNA吸附柱和和RNA吸附柱处理范围，否则会造成DNA残留或者产量降低。在不清楚样品DNA/RNA含量时建议先使用较少的样品处理量，后面根据具体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：

在总 RNA 提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留，本产品中配备了独有的缓冲体系和吸附膜，在大多数 RT-PCR 扩增过程中微量的 DNA 残留影响不大，如果要进行 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR，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。

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。

4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在吸附柱上进行 DNase I 处理。

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×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，本产品标准以达到 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/μl）= (OD260)×(稀释倍数 n)×40。

【使用方法】

提示：1）首次使用请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇。

2)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 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($5x10^8$ 细胞)/ 200μl($5x10^8$-$7.5x10^8$ 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℃)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℃温育 15 分钟。不同细菌类型破壁难易程度不同，难破壁的种类需要根据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 500μl 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见不到明显团块或者不溶物，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 500μl，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 700μl，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 700μl 去蛋白液 RW1，室温放置 30 秒，13，000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

10. 加入 500μl 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 500μl 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 30-50μl 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>30μg，加 30-50μl 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%，此操作浓度会降低，请根据需要做出选择。裂解液 RLT Plus 最大处理量不超过 10^7 个细胞。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。