

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	35 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	5 ml
DP225-105	TE (PH8.0)	10 ml
DP225-106	溶菌酶	30 mg
DP225-107	吸附柱&收集管	100 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 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. 本产品可去除体系中绝大部分的 DNA 残留，纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase I 处理即可用于下游实验操作。不同样本核酸含量相差大，如果下游实验对微量 DNA 十分敏感，可以使用 DNase I 进一步清除 DNA 污染。

【使用方法】

提示：1) 首次使用请先在漂洗液 RW 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 溶液, TE 溶液中需要加入溶菌酶或者 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, 残留的上清不超过 20 μ l/每使用 100 μ l 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 100 μ l(5×10^8 细胞)/ 200 μ l(5×10^8 - 7.5×10^8 细胞) TE 溶液中, 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. 13, 000 rpm 短暂离心 1 min 收集细胞到管底, 吸弃上清。涡旋振荡重悬分散细胞, 室温育 5 min/溶菌酶, 或者 37° C 温育 15 min/lysostaphin, 破解细胞壁。每 2 min 涡旋振荡 10 sec 帮助破壁。

提示: 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 15 mg/ml 和温育时间到 10 min。如果是金黄色葡萄球菌需要加入 lysostaphin 到 1 mg/ml, 37° 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玻璃珠击打, 机械破壁, 蛋白酶 K 消化等方法帮助破壁。

4. 离心 1 min 收集细胞到管底, 吸弃上清。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 秒, 充分裂解。

提示: 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. 将处理好的裂解物加入一个吸附柱上(吸附柱柱放在收集管内) 13,000 rpm 离心 1min, 保留滤过液(RNA 在滤过液中)。
7. 向滤液中加入 0.5 倍滤液体积的无水乙醇(约 250 μ l), 移液器吹打混匀。

提示: 若加乙醇后出现浑浊或有絮状物产生, 属正常现象, 立即吹打混匀, 不要离心。

如果习惯按照原版本说明书加等体积 70%乙醇, 可以自配 70%乙醇按照等体积加 500 μ l。

70%乙醇配制方法: 按照 9 ml RNase free H₂O+21 ml 无水乙醇加到一个新的塑料瓶子里面混匀即可), 如果少量使用, 可以按照上述比例少量配制。

8. 立刻将混合物加入一个吸附柱中, (吸附柱放入收集管中), 静置 1 min, 13,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液, 将吸附柱放回收集管。
9. 向加吸附柱中加入 700 μ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 秒, 13, 000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
10. 向吸附柱中加入 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 15 秒, 弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW, 重复一遍。
11. 将吸附柱放回空收集管中, 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. 将柱转移至新的 1.5 ml 离心管中, 向吸附柱膜中央悬空滴加 30-50 μ l 的 RNase-free ddH₂O, 静置 1 min, 13, 000 rpm 离心 1 min。
提示: 洗脱体积建议不少于 30 μ l, 体积过小会影响核酸回收效率。
以下步骤都可以帮助提高 RNA 产物浓度:
RNase-free ddH₂O 于洗脱前先在 70-90° C 预热;
将第一次洗脱液重新加入吸附柱进行第二次洗脱。
13. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或-80°C 保存。

【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。