



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

GREENspin 细菌RNA快速提取试剂盒

(目录号: ZP410)

ZOMANBIO

为生命科学研究探索提供每一款好的产品

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

Order: 010-6261-7225

Free Phone: 400-611-2007

Technical: 010-6297-9301

Fax: 010-6296-8805

Email: zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

实验室使用，仅用于科研
北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

目录编号	包装单位
ZP410-01	20次
ZP410-02	50次

■ 适用范围：

适用于快速提取细菌总RNA

■ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	20次	50次
TE (PH8.0)	室温	6 ml	6 ml
溶菌酶	4℃	20 mg	20 mg
裂解液RLT	室温	20 ml	50 ml
去蛋白液RW1	室温	15 ml	40 ml
漂洗液RW	室温	5 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	10ml
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	10 ml
RNase-free 吸附柱RA和收集管	室温	20套	50套

本试剂盒在室温储存12个月不影响使用效果。

■ 储存事项：

1. 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℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温（4℃或者-20℃）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℃）进行。
3. 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：

独特的裂解液/ β -巯基乙醇迅速裂解细胞和灭活细胞RNA酶，然后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-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 H₂O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世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在30分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀典型的比值达1.9~2.0，基本无DNA残留，可用于RT-PCR，Northern-blot和各种实验。

■ 注意事项：

1. **第一次使用前请先在漂洗液RW瓶加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！**

2. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。

3. 需要自备乙醇，β-巯基乙醇。

4. 裂解液RLT 和去蛋白液RW1中含有刺激性化合物，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。**

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) 使用无RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。

3) RNA 在裂解液RLT 中时不会被RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase 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0.5 M NaOH 中浸泡10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。

4) 配制溶液应使用无RNase 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,本公司的GREENspin系列RNA提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，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。本试剂盒还可以用于DNase I处理后的RNA清洁(cleanup),请联系我们索取具体操作说明书。

4) 在步骤去蛋白液RW1漂洗前，直接在吸附柱RA上进行DNase I处理。请联系我们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。由于细胞中70%-80%的RNA 为rRNA，电泳后UV 下应能看到非常明显的rRNA 条带。动物rRNA 大小分别约为5 kb 和2kb，分别相当于28S 和18S rRNA。动物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指标。高质量的RNA，OD260/OD280 读数 (10mMTris, pH7.5) 在1.8-2.1 之间。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

■ 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!
- 操作前在裂解液RLT中加入 β -巯基乙醇至终浓度1%，如1 ml RLT 中加入10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RLT 4°C可放置一个月。
- 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(108-109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(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 \times 10⁸细胞)/ 200 μ l(5 \times 10⁸-7.5 \times 10⁸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°C)温育5分钟/溶菌酶,或者37°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。

注意各种细菌破壁的难易程度不一样,一般革兰氏阴性菌使用上面的条件就足够了,甚至可能省略该步骤,但是某些阳性难破壁需要提高溶菌酶浓度或者使用lysostaphin,玻璃珠机械破壁,蛋白酶K消化或者联合使用等方法, 需要根据用户自己的具体情况调节酶的工作浓度和温育温度、时间和选择正确的方法。

4. 加入350 μ l (如果上面使用100 μ l TE/酶) 或者700 μ l (如果上面使用200 μ l TE/酶) 裂解液RLT , 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。

5. 加入250 μ l 96 - 100%乙醇 (曾加入100 μ l TE/350 μ l RLT管) 或者500 μ l96 - 100%乙醇 (曾加入200 μ l TE/700 μ l RLT管) , 立即吹打混匀。

6. 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) 13,000 rpm离心60秒, 弃掉废液。

7. 加700 μ l 去蛋白液RW1, 室温放置30秒, 12,000rpm 离心30秒, 弃掉废液。**如果DNA残留明显,可在加入RW1后室温放置5分钟再离心。**

8. 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30秒, 弃掉废液。加入500 μ l漂洗液RW,重复一遍。

9. 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。

10. 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30-50 μ l RNase free water (事先在 70-90°C水浴中加热效果更好) , 室温放置1分钟, 12,000 rpm 离心1分钟。

11. 如果预期RNA产量>30 μ g,加30-50 μ l 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%,但是浓度要低,用户根据需要选择。