



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2018-05-29

# 细菌总RNA快速提取试剂盒 (离心柱型)

## Bacteria Total RNA Kit

目录号: ZP403

试剂盒组成	ZP403-1 50次	ZP403-2 100次
细胞悬浮液	10 ml	30 ml
溶菌酶 (100mg/ml)	500 $\mu$ l	2 $\times$ 500 $\mu$ l
细胞裂解液R	50 ml	100 ml
漂洗液RW (加乙醇后使用)	15 ml	2 $\times$ 15 ml
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	10 ml	30 ml
RNase-free 吸附柱	50个	100个
RNase-free收集管 (2 ml)	50个	100个
说明书	1份	1份

### ■ 储存条件

细胞裂解液R 4°C放置; 溶菌酶 (100 $\mu$ g/ $\mu$ l) -20°C保存; 其他试剂室温保存。

另外, 为了去除RNA中少量残存的DNA, 客户可根据需要购买DNase I。

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.



## ■ 产品简介

本试剂盒可从细菌细胞中快速提取总RNA，可同时处理大量不同样品。提取的总RNA纯度高，没有蛋白和其他杂质的污染，可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern blot、Dot blot、polyA筛选、体外翻译、RNase保护分析和分子克隆等多种下游实验。

## ■ 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在细菌细胞裂解液中时不会被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0.5M 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RNase-free ddH<sub>2</sub>O。将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1% (v/v)，混匀后放置过夜，高压灭菌。

## ■ 使用前注意事项

1. 裂解液在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
2. 第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。

## ■ 操作步骤

1. 4°C 12000rpm (~13400×g)离心2分钟收集菌体（收集菌体的最大量不超过 $1 \times 10^9$ ），仔细去除所有培养基上清。

**注：如果培养基上清去除不完全，将对第二步中的细胞壁消化过程产生抑制。**

2. 用含有溶菌酶的100μl细胞悬浮液（客户自己配制，配制方法见下表）彻底重悬菌体，孵育时间见下表。

	细胞悬浮液中的溶菌酶终浓度	孵育时间（室温）
G - 细菌	400 μg/ml	3 - 5 min
G + 细菌	3 mg/ml	5 - 10 min

3. 加入1ml细胞裂解液R，涡旋振荡混匀，若出现不溶性沉淀，12000rpm (~13400×g)离心2分钟，将上清转移至另一离心管中。
4. 每1ml细胞裂解液R加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡（涡旋亦可）15秒并将其在室温下孵育3分钟。
5. 于4°C 12000rpm离心10分钟，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R体积的60%，把水相转移到新管中，进行下一步操作。
6. 加入0.5倍体积**无水乙醇**，颠倒混匀（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中，吸附柱套在收集管内。
7. 4°C 12000rpm离心45秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
8. 向吸附柱中加入500μl漂洗液RW（**使用前请先检查是否已加入乙醇**），室温静置30秒，4°C 12000rpm (~13400×g)离心30秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。重复步骤8。
9. 4°C 12000rpm (~13400×g)离心2分钟，丢弃收集管，将吸附柱转入一个新的RNase-free离心管中，将打开的吸附柱置于超净台中室温放置2分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的RT等实验。**



10. 向吸附膜的中间部位悬空滴加60-100 $\mu$ l RNase-free ddH<sub>2</sub>O，室温放置2分钟，4 $^{\circ}$ C 12000 rpm(~13400 $\times$ g)离心1分钟，得到RNA溶液。

**注意：**洗脱缓冲液体积不应少于60 $\mu$ l，体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70 $^{\circ}$ C保存。

## ■ 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 $\times$ 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。28S rRNA的量约为18S rRNA的两倍，说明RNA的完整性较好。

**纯度：**OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>读数在1.8-2.1之间，比值为2.0是高质量RNA的标志。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>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OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>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 ddH<sub>2</sub>O稀释n倍，用RNase-free ddH<sub>2</sub>O将分光光度计调零，取稀释液进行OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times (\text{稀释倍数}n) \times 40$$

### DNase I储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550  $\mu$ l RNase-free ddH<sub>2</sub>O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。

**DNA reaction buffer:** 100mM Tris-HCl（pH 7.5）

25mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM CaCl<sub>2</sub>

**注意：**从-20 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。