

细菌 RNA 小提试剂盒简明说明书（R6616）

产品简介

本试剂盒提供一种简便、快速的方法，可在 30 分钟内从革兰氏阳性菌（枯草芽孢杆菌）和革兰氏阴性菌（大肠杆菌）中提取 RNA。结合 ezBind RNA 技术的可逆结合特性，并配有专门设计的缓冲液系统，可在 RNA 分离前有效去除 DNA。裂解液通过 DNA Clearance Column，去除基因组 DNA。必要时，使用 DNase I（详见操作步骤）可消除微量的基因组 DNA。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
Buffer LY	4.8 mL	28 mL	135 mL
Buffer RB	6 mL	30 mL	135 mL
RNA Wash Buffer	3 mL	24 mL	3x24 mL
DEPC-Treated ddH ₂ O	1.2 mL	10 mL	30 mL
DNA Clearance Columns	10	50	250
RNA Columns	10	50	250
2 mL Collection Tubes	20	100	500
1.5 mL RNase-free Microfuge Tubes	10	50	250
Lysozyme	3 mg	15 mg	75 mg
User Manual	1	1	1

要点

- RNA Wash Buffer：使用前请将 12 mL (R6616-00)或 96 mL (R6616-01)或 96 mL (R6616-02) 96-100%乙醇加入至每个

RNA Wash Buffer 瓶内。

- Buffer LY：使用前在 Buffer LY 内加入 1%的β-巯基乙醇，并储存于 4℃。
- 准备 Lysozyme 的储存液：3 mg/mL 或 0.4 mg/mL 溶于 Elution Buffer 或 TE Buffer，分装至小管，并储存于 -20℃，使用前解冻。
- 所有操作（包括离心）均在室温下进行。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。Lysozyme 储存于 -20℃，其他试剂及用品可保存于室温（4-28℃）。

实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- β-巯基乙醇
- 小型台式离心机

操作步骤

1. 在合适的培养基和合适的温度下，过夜培养细菌。次日，将过夜培养的菌液以 1:50 扩大培养，直至 OD₆₀₀ 读数在 0.6~1.0（大概需要几个小时）。

注：如果细菌生长太慢，减小稀释倍数，不要使用过夜培养的菌液来提取 RNA。

2. 收集不超过 3 mL 的菌液（< 5x10⁸），3,000 rpm 离心 10 min。
3. 尽可能小心地将上清液去除干净。
4. 将菌体重悬于 **100μL** 新鲜配制的含有 **Lysozyme** 的 TE Buffer

（10 mM Tris-HCl, pH8.0; 1 mM EDTA, pH8.0）或 Elution Buffer（10 mM Tris-HCl, pH8.5）。用枪头吹打混匀。

注：革兰氏阳性菌中加入 3 mg Lysozyme/ 1 mL TE Buffer，革兰氏阴性菌中加入 0.4 mg Lysozyme/ 1 mL TE Buffer。

5. 革兰氏阳性菌：室温静置 5~10 min；革兰氏阴性菌：室温静置 3~5 min。

6. 加入 **400 μL Buffer LY**，混合均匀。将澄清的裂解液转移至一个 **DNA Clearance Column**（自带 **2 mL Collection Tube**），13,000 rpm 离心 2 min，丢弃 **DNA Clearance Column**，保留滤液。

注：此步骤用于去除基因组 DNA。确保使用前按要求在 **Buffer LY** 内加入 β-巯基乙醇。

7. 转移滤液至一个无 RNase 的离心管，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，（例如：250 μL 的无水乙醇加入至 500 μL 裂解液中）。

8. 转移上述混合液至一个 **RNA Column**，13,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，将 **RNA Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

9. 加入 **500 μL Buffer RB**，13,000 rpm 离心 30 s，弃滤液。

10. 加入 **500 μL RNA Wash Buffer**，13,000 rpm 离心 30 s，弃滤液。

注：确保使用前按要求在 **RNA Wash Buffer** 内加入乙醇。

11. 加入 **500 μL RNA Wash Buffer**，13,000 rpm 离心 30 s，弃滤液，将 **RNA Column** 放入一个新的 **2 mL Collection Tube**。

12. 打开柱子盖子，13,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

注：开盖离心有助于去除残留的乙醇，对于最佳洗脱非常重要。

13. 将 **RNA Column** 转移至一个 **1.5 mL RNase-free Microfuge Tube**，在膜中央加入 **50~100 μL DEPC-Treated ddH₂O**，13,000

rpm 离心 2 min。RNA 存在于滤液中，将 RNA 溶液储存在-20℃。

注：强烈建议在开始下游实验前确定 RNA 的质量，RNA 的质量可通过溴化乙锭染色变性琼脂糖凝胶电泳测定。凝胶上应该出现几条清晰的条带，包括 28 S 和 18 S 核糖体 RNA 条带，以及一定的 mRNA 条带。若这些条带向较低分子量的 RNA 弥散，那么 RNA 在制备、处理或储存过程中发生了很大降解，低于 200 个碱基的 RNA 分子不能有效地结合 RNA Column。A₂₆₀/A₂₈₀ 的值在 1.8~2.0 相当于 90~100%的纯核酸。

可选步骤：使用 DNase 消化去除基因组 DNA

一些下游实验例如低丰度的靶基因 RT-PCR，对少量的 DNA 非常敏感，需要用到 DNase 消化。通常来说，不需要这样做，因为本试剂盒已选择性提取 RNA 并去除了绝大部分 DNA。若存在 DNA 污染，要么减少组织或细胞的使用量。

Catalog#	D001-00	D001-01	D001-02
Preps	10	50	250
DNase I*	60 u	260 u	1300 u
1 x DNase I Buffer*	600 µL	3 mL	15 mL
DNase Stop Buffer*	500 µL	2.4 mL	12 mL

*DNase I 和 DNase stop Buffer 不在 R6611 中提供,可向 BEIWO 单独购买。

*DNase Stop Buffer：使用前向 DNase Stop Buffer 加入 2 mL (D001-00) 或 9.6 mL (D001-01) 或 48 mL (D001-02) 无水乙醇。

操作步骤（DNase 消化去除基因组 DNA）

1. 将样品转移至 RNA Column 后,按下面操作进行 DNase I 消化。
2. 将 RNA Column 置于 2 mL Collection Tube,加入 **500 µL Buffer RB**，按先前的操作步骤离心并弃上清，重复使用收集管。

3. 加入 **50 µL DNase I(2U, RNase-free)混合液**至 RNA Column 膜中央,室温静置 15 min。加入 **200 µL DNase Stop Buffer**, 13,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。加入 **300 µL RNA Wash Buffer**，13,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

常见问题解答

问题	可能原因	建议
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比值低	蛋白污染	使用苯酚：氯仿萃取，RNA 损失预计在 40%以内。
	硫氰酸胍污染	加入 2.5 倍体积的乙醇和 0.1 M 的 NaCl（终浓度）来沉降 RNA，-20℃ 孵育 30 min，4℃，10,000 x g 离心 15 min, 用 DEPC-Treated ddH ₂ O 重悬 RNA 沉淀。
低得率	样品中 RNA 已降解	采集样品后快速液氮冷冻并储存于 -70℃。
	样品加载量超过了 RNA 柱的最大吸附能力	减少组织样品的加入量。
	乙醇没有加入至 RNA Wash Buffer 中	纯化前在 RNA Wash Buffer 内按要求加入一定量的乙醇。
基因组 DNA 污染	RT-PCR 加入过量 RNA	减少 RT-PCR 反应时 RNA 的加入量，控制在 50~100 ng。
	样品富含 DNA	减少样品初始使用量，30 mg 左右的样品初始使用量大多会出现基因组污染的情况。减少细胞数目至 1~2 x 10 ⁶ ，增加 buffer 的使用量，分批次多

		上几次 RNA 柱子。
--	--	-------------

杭州倍沃医学科技有限公司

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

market@beiwobiomedical.com