



细菌 RNA 快速提取试剂盒 (CB 型)

Cat. No. ZH0188

保存: 室温

组分说明:

Kit Size	50
Buffer RL	35 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	11 ml
RNase-Free Water	10 ml
Shredder Spin column	50
Spin Column RM	50
Collection Tube (1.5 ml)	50
Collection Tube (2 ml)	100

产品简介

本试剂盒采用高效、专一结合核酸的离心吸附柱和独特的缓冲系统, 可从细菌或培养的动物细胞中快速提取总 RNA, 30-40 分钟内即可完成反应。提取的总 RNA 纯度高, 没有蛋白质和其他污染, 如果是对微量 DNA 非常敏感的 RNA 实验, 残留的 DNA 可利用无 RNase 的 DNase I 在柱上进行消化去除。提取的 RNA 适用于 RT-PCR、Real-Time RT-PCR、芯片分析、体外翻译等实验。

注意事项

1. 预防 RNase 污染, 应注意以下几方面:

1) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头, 避免交叉污染。

2) 玻璃器皿应在使用前于 180°C 高温下干烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟, 用水彻底冲洗后高压灭菌。

3) 配制溶液应使用无 RNase 的水。

4) 操作人员戴一次性口罩和手套, 实验过程中要勤换手套。

2. 提取的样品避免反复冻融, 否则影响 RNA 提取的量和质量。

3. 使用前请检查 Buffer RL 是否出现结晶或者沉淀, 可置于 56°C 水浴重新溶解。Buffer RL 在使用前请加入 β -巯基乙醇, 至终浓度为 1%。如 1 ml Buffer RL 加 10 μ l β -巯基乙醇。加入 β -巯基乙醇的 Buffer RL 室温可保存 1 个月。

4. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在 Buffer RW2 中加入无水乙醇。

5. 所有离心步骤若无特殊说明均在室温下进行, 且所有操作步骤动作要迅速。

6. 若下游实验对 DNA 非常敏感, 建议用不含 RNase 的 DNase I (货号: CW2090A) 对 RNA 进行处理。

自备试剂: Lysozyme、TE 缓冲液、 β -巯基乙醇、无水乙醇 (新开封或提取 RNA 专用)

操作步骤

1. 4°C 10,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 分钟收集菌体 (菌体量最大不超过 1×10^9), 小心去除所有上清。

注意: 上清如果有残留, 会影响后续的消化过程。

2. 用含有 Lysozyme 的 100 μ l TE 缓冲液彻底重悬菌体, 室温孵育。具体配方和孵育时间如下:



	TE 缓冲液中 Lysozyme 的终浓度	孵育时间
G ⁻ 细菌	400 µg/ml	3-5 分钟
G ⁺ 细菌	3 mg/ml	5-10 分钟

3. 加入 350 µl Buffer RL (使用前请检查是否加入 β-巯基乙醇), 涡旋震荡混匀 (此步骤可能出现不溶性沉淀)。将溶液与沉淀全部加入到已装入收集管 (Collection Tube 2 ml) 的过滤柱 (Shredder Spin Column) 中, 10,000 rpm 离心 2 分钟, 收集滤液, 弃掉过滤柱。

4. 向上步得到的滤液中加入 250 µl 无水乙醇, 混匀 (此时可能会出现沉淀)。将得到的溶液和沉淀一起转入到已装入收集管 (Collection Tube 2 ml) 的吸附柱 (Spin Column RM) 中, 10,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

5. 向吸附柱中加入 700 µl Buffer RW1, 10,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

可选步骤: 如果要进行对微量 DNA 非常敏感的 RNA 实验, 则用以下步骤替代步骤 5。

1) 向吸附柱中加入 350 µl Buffer RW1, 10,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

2) 配制 DNase I 混合液: 取 52 µl RNase-Free Water, 向其中加入 8 µl 10 × Reaction Buffer 和 20 µl DNase I (1 U/µl), 混匀, 配制成终体积为 80 µl 的反应液。

注意: 以上体系为按照我公司产品 DNase I 反应体系进行配置, 应用其他公司产品请参考相应说明书。

3) 向吸附柱中直接加入 80 µl DNase I 混合液, 20-30°C 孵育 15 分钟。

4) 向吸附柱中加入 350 µl Buffer RW1, 10,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

6. 向吸附柱中加入 500 µl Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇), 10,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

7. 重复步骤 6。

8. 12,000 rpm 离心 2 分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。

注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除, 乙醇残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR 等)。

9. 将吸附柱置于一个新的无 RNase 的离心管 (Collection Tube 1.5 ml) 中, 向吸附柱的中间部位加入 30-50 µl RNase-Free Water, 室温放置 1 分钟, 10,000 rpm 离心 1 分钟, 收集 RNA 溶液, -70°C 保存 RNA, 防止降解。

注意: 1) RNase-Free Water 体积不应小于 30 µl, 体积过小影响回收率。

2) 如果要提高 RNA 的产量, 可用 30-50 µl 新的 RNase-Free Water 重复步骤 9。

3) 如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 9。