



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ **EASYspin** 细菌 RNA 快速提取试剂盒
- ◆ 目录号 **RN08**
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

---

## EASYspin 细菌 RNA 快速提取试剂盒

目录号: **RN08**

目录编号	包装单位
<b>RN0801</b>	<b>20次</b>
<b>RN0802</b>	<b>50次</b>

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

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°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温 (4°C 或者 -20°C) 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°C - 25°C) 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 在高离子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 H<sub>2</sub>O 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, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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。
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℃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℃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 EASYspin 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,我们建议在进行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 (10mM Tris, 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!

⇒ 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( $10^8$ - $10^9$  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 $\mu$ l/每使用 100 $\mu$ 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 $\mu$ l( $5 \times 10^8$  细胞)/ 200 $\mu$ l( $5 \times 10^8$ - $7.5 \times 10^8$  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 $^{\circ}$ C)温育 5 分钟/溶菌酶, 或者 37 $^{\circ}$ 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 $\mu$ l (如果上面使用 100 $\mu$ l TE/酶) 或者 700 $\mu$ l (如果上面使用 200 $\mu$ 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 $\mu$ l 96-100% 乙醇 (曾加入 100 $\mu$ l TE/350 $\mu$ l RLT 管) 或者 500 $\mu$ l 96-100% 乙醇 (曾加入 200 $\mu$ l TE/700 $\mu$ l RLT 管), 立即吹打混匀。

---

6. 立刻将混合物(每次小于 700 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l RNase free water (事先在 70-90 $^{\circ}$ 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 $\mu$ g,加 30-50 $\mu$ 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。**