

细菌总 RNA 快速提取试剂盒

货号: NG322S 50次
NG322M 100次

试剂盒组成	保存	50 次	100 次
溶菌酶	4°C	25mg	50mg
裂解液 RL	4°C避光	50 ml	100 ml
去蛋白液 RE	室温	25 ml	50 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml	25 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	10 ml
RNase-free 吸附柱	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个

储存事项:

1. 运输和储存均在室温下 (15°C - 25°C) 进行。裂解液 RL 可以常温运输，收到后 **4°C避光可长期保存，常温保存 3 个月也不影响使用质量。**
2. 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:

改进的异硫氰酸胍/酚一步法 (NGzol 法) 裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后总 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 water 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特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的 RL 裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
5. 有效的去除了 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。

注意事项

1. **第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！**
2. 本试剂盒抑制 RNA 酶效果极佳，所有离心步骤如未加说明，均可在常温进行。
3. 裂解液 RL 和去蛋白液 RE 中含有刺激性有害化合物，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。**
4. 考虑到环保问题，本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，使用前需要自备氯仿。
5. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析 RNA 的质量。好的 RNA 产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体 RNA 带，分别为~5Kb (28S)，~2Kb (18S)，条带亮度比值约为 2: 1。有时候也可以看到~0.1kb 0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到 4, 5 条带也属于正常现象，如果 RNA 未成熟的前体或者不均一核 RNA、小核 RNA 提取出来也可能看到介于 7Kb 和 15Kb 之间的不连续的高分子量条带。
6. 检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 吸光度比值时，如需稀释 RNA 样品应该用 TE (PH 8)，如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和 PH 值低，会使 OD₂₈₀ 升高，从而使比值降低。
7. 加入裂解液 RL 匀浆后，加氯仿前，样品可在 -60°C-70°C 保存一个月以上。

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！

注：提取细菌 RNA 需先配制加溶菌酶的 TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA PH8.0), (自备)

TE 中溶菌酶的终浓度为：

G⁻ 细菌加 1mg/ml. 37°C 孵育 5 分钟左右。

G⁺ 细菌加 5mg/ml 37°C 孵育 10-15 分钟左右。

1. 离心收集 1-2ml 菌液(约 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 μ l。
2. 根据细胞的种类和数量,充分重悬细胞在 100 μ l(< 5×10^8 细胞) TE 中 (TE 中需先加入溶菌酶) 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，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 i E.coli 使用上面的条件就足够了，甚至可能省略该步骤，但是某些革兰氏阳性菌如 . 难破壁需要提高溶菌酶浓度到 3-5mg/ml 和温育时间到 10 分钟。如果金黄色葡萄球菌需要加入 nlysostaphin 到 1mg/ml，37°C 温育 5- 15 分钟。总之不同细菌类型破壁难易程度不同，有的难破壁的种类需要根据用户自己的具体情况调节酶的种类，工作浓度和温育温度时间，此外还可以联合使用蛋白酶 K 消化等方法帮助破壁。

4. 短暂离心收集细胞到管底，吸弃上清。涡旋振荡重悬分散细胞。
5. 加 1ml 的裂解液 RL 后匀浆。组织样品容积不能超过 RL 容积的 10%。将匀浆样品剧烈震荡混匀，在 15-30°C 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。

可选步骤：4°C 12,000 rpm 离心 10 min，小心取上清转入一个新的 RNase free 的离心管中。当样品富含蛋白质、脂肪、多糖或是细胞外物质例如肌肉、脂肪组织或植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在 2~8°C 12,000 rpm 离心 10min，移除匀浆中不溶解的物质，余下的沉淀中包含有细胞外膜、多糖、以及高分子量 DNA，而上层的超浮游物含有 RNA。

6. 每 1mlRL 加 0.2 ml 氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡 15 sec 并将其在室温下孵育 3 min。
7. 于 4°C 12,000 rpm 离心 10 min，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 RL 体积的 50%，把水相小心转移到新管中（不要触碰中间层），记录水相体积。
8. 加入水相体积一半也就是 0.5 倍体积的无水乙醇，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 RA 中（吸附柱套在收集管内，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱 RA 中，请分两次转入吸附柱 RA 中。），12,000 rpm 离心 45 sec，弃废液，将吸附柱重新套回收集管。
9. 加 500 μ l 去蛋白液 RE，12,000 rpm 离心 45 sec，弃废液。
10. 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 45 sec，弃废液。
11. 重复步骤 10 一次。
12. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
13. 取出吸附柱 RA，放入新 RNase free 离心管中，根据预期 RNA 产量**在吸附膜的中间部位**加 50-80 μ l RNase free water，室温放置 2min，12,000 rpm 离心 1 min。如果需要较多 RNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心 1 min，或者另外再加 30 μ l RNase free water，离心 1 min，合并两次洗脱液。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 RNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于 30 μ l，体积过小降低 RNA 洗脱效率，减少 RNA 产量。