

M5 EASYspin Plus 细菌 RNA 快速提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 EASYspin Plus 细菌 RNA 快速提取试剂盒	50T	MF157-01

【储存条件】

1. 所有溶液应该是澄清的，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，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。

【产品简介】

聚合美推出 EASYspin 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，又独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后裂解混合物通过一个基因组 DNA 清除柱，基因组 DNA 被清除而 RNA 穿透滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，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 H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

【产品特点】

1. 完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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。

【产品组份】

	50T	注意事项
TE (pH8.0)	6 ml	室温密闭干燥保存
溶菌酶	20mg	4°C 保存
裂解液 RLT plus	25 ml	室温密闭干燥保存
去蛋白液 RW1	40 ml	室温密闭干燥保存
漂洗液 RW	10ml	初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇
70%乙醇	9ml	初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇
RNase-Free H ₂ O	10ml	室温密闭干燥保存
基因组 DNA 清除柱和收集管	50 套	室温密闭干燥保存
RNase-Free 吸附套管(RA)	50 套	室温密闭干燥保存

【注意事项】

1. 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。
2. 样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时宁可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
3. 裂解液 RLT Plus 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，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. 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 (DNase 消化也无法做到 100%无残留), 本公司的 EASYspin Plus RNA 提取产品, 由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术, 绝大多数 DNA 已经被清除, 不需要 DNase 消化, 可直接用于反转录 PCR 和荧光定量 PCR。个别特殊情况如 DNA 含量过于丰富造成残留或者要进行严格的 mRNA 表达量分析荧光定量 PCR, 我们建议在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。

5. 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参考指标。高质量的 RNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数 (10mM Tris, pH7.5) 在 2.1-2.2 之间 (100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右, 很多公司无法达到这个标准, 所以 1.9-2.0 就凑合用了, 但是我们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2)。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】

提示:

<第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇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的 TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA PH8.0), TE 中溶菌酶的终浓度为 1mg/ml>

1. 离心收集 1-2ml 菌液(约 10⁸-10⁹ 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 20μl。
2. 根据细胞的种类和数量,充分重悬细胞在 100μl (<5×10⁸ 细胞) / 200μl (5×10⁸-7.5×10⁸ 细胞) TE 中 (TE 中需先加入溶菌酶, 终浓度为 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℃)温育 5 分钟/溶菌酶, 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 E.coli 使用上面的条件就足够了,甚至可能省略该步骤, 但某些革兰氏阳性菌如 B. subtilis 难破壁需要提高溶菌酶浓度到 15mg/ml 和温育时间到 10 分钟。如果金黄色葡萄球菌需要加入 lysostaphin 到 1mg/ml, 37℃温育 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玻璃珠击打, 机械破壁, 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. 加入 500μl 裂解液 RLT Plus, 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, 取裂解物上清进行下一步。

6. 立刻将裂解物加入一个 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内) 13,000 rpm 离心 60 秒, 保留滤过液 (RNA 在滤过液中)。确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。
7. 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (通常为 500μl, 滤过时候损失体积应该减去), 加入等体积的 70%乙醇 (请先检查是否已加入无水乙醇), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

8. 立刻将混合物(每次小于 700 μ 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。
9. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
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 30 秒, 弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW,重复一遍。
11. 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。
12. 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 μ l RNase free water (事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量), 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。
13. 如果预期 RNA 产量>30 μ g,加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 12, 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)。
14. 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。

**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。