

产品组分

组分名称	组分编号	规格	保存条件
		50 RXN	
裂解液 RL1 (Buffer RL1)	RM30140	25 mL	RT
去蛋白液 PR2 (Buffer PR2)	RM30141	35 mL	RT
溶菌酶 (Lysozyme)	RM30205	20 mg	4°C
漂洗液 WB2 (Buffer WB2)*	RM30144	12 mL	RT
RNase-free 吸附柱和收集管 (RNase-free Adsorption Column and Collection Tubes)	RM30185	50 pk	RT
gDNA 清除柱和收集管 (gDNA Remove Column and Collection Tubes)	RM30186	50 pk	RT
1.5 mL RNase-free Centrifuge Tubes	RM30202	50 pk	RT
TE (pH 8.0)	RM30204	6 mL	RT
RNase-free H ₂ O	RM30142	5 mL	RT

*注: 50 RXN漂洗液Buffer WB2使用前加入48 mL无水乙醇。

产品说明

本试剂盒不依赖于苯酚、氯仿等有毒试剂, 可用于各类细菌样本 RNA 快速提取, 独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 裂解混合物通过一个 gDNA 清除柱, gDNA 被清除而 RNA 穿透滤过。使用乙醇调节结合条件后, 滤过的 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, 最后低盐的 RNase-free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱, 提取的 RNA 可直接用于 RT-PCR、qPCR 及 RNA 建库等实验。

保存温度

本试剂按照说明储存 18 个月不影响使用效果。保存和运输均可在室温进行。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。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员进行科学研究使用, 不得用于临床诊断或治疗。
2. 所有离心步骤均在室温进行, 使用转速 $\geq 13,000$ rpm (~ 14,000 x g) 的离心机。
3. Buffer RL1、Buffer PR2 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. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶, 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
5. 本试剂盒可去除体系中绝大多数的 DNA 污染, 纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase I 处理即可用于下游实验操作。如果下游实验对痕量 DNA 十分敏感, 可以使用 DNase I 进一步清除 DNA 污染。
6. 使用本试剂盒时, 请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩、使用 RNase-free 耗材, 避免 RNase 污染。

操作说明（请先阅读注意事项）

自备材料

无水乙醇

实验前准备

1. 第一次使用前请先在 50 RXN 漂洗液 WB2 瓶加入 48 mL 的无水乙醇!
2. 使用前需检查 Buffer RL1 是否有沉淀, 如果有沉淀, 需要在 65°C 水浴来溶解, 沉淀, 待溶液澄清后方可使用。
3. 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), 使得 TE 中溶菌酶或者 lysostaphin 的浓度为 1 mg/mL, 例如取 1 mL 的 TE 加入 1 mg 的溶菌酶。尽量现配现用, 避免酶失活, 若当次使用不完, 加入溶菌酶的 TE 可放 -20°C 保存, 须提前预估好需求量。

实验步骤

1. 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 30 sec 收集 1-2 mL 菌液 (10^8 - 10^9 个细胞) 到一个 1.5 mL 离心管 (自备), 尽可能去除上清 (上清去除不完全可能影响下游裂解细胞壁的效果)。根据细胞的种类和数量, 取 100~200 μ L 的 TE 充分重悬细胞。每 5×10^8 个细胞加入 100 μ L TE, 5×10^8 - 7.5×10^8 细胞加入 200 μ L TE (TE 中已加入溶菌酶或者 lysostaphin, 浓度为 1 mg/mL)。

2. 室温 (15-25°C) 温育 5 min/溶菌酶, 或者 37°C 温育 15 min/ lysostaphin, 破解细胞壁。每 2 min 涡旋振荡 10 sec 帮助破壁。

注: 细菌破壁的难易程度不一, 一般革兰氏阴性菌 *E.coli* 使用上面的条件已足够, 甚至可省略该步骤, 但某些革兰氏阳性菌如 *B. subtilis* 难破壁, 需要提高溶菌酶浓度至 15 mg/mL, 延长温育时间至 10 min。如果样本为金黄色葡萄球菌, 则需要加入 lysostaphin 到 1 mg/mL, 37°C 温育 15 min。

3. 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。
4. 加入 500 μ L 裂解液 Buffer RL1, 吹打混匀后用手剧烈振荡 20 sec, 充分裂解。
5. 将上一步中裂解结束的样本转移至放好收集管的 gDNA 清除柱中, 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 30 sec, 丢弃 gDNA 清除柱, **收集滤液 (RNA 在滤液中)**。
6. 向滤液中加入 0.5 倍滤液体积的无水乙醇, 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。
7. 将上述混合液加入至放好收集管的 RNase-free 吸附柱中, 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 30 sec, **倒去滤液**。
8. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中, 向吸附柱中加入 700 μ L 的去蛋白液 PR2, 室温放置 30 sec, 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 30 sec, **倒去滤液**。
9. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中, 向吸附柱中加入 500 μ L 的漂洗液 WB2 (**确认使用前已加入无水乙醇**), 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 30 sec, **倒去滤液**。
10. 重复上述步骤 9 一次。
11. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中, 空管 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 2 min, 去除残留在吸附柱中的漂洗液 WB2。
1. 取出 RNase-free 吸附柱放至 1.5 mL RNase-free 的离心管中, 向**吸附柱的中间部位**悬空加入 30-50 μ L RNase-free dd H₂O, 室温静置 2 min 后, 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 1 min, 将 RNA 洗脱下来。

注: 洗脱缓冲液体积不应少于 30 μ L, 体积过小影响回收效率。如果需要得到更大浓度的 RNA, 可将离心得到的 RNA 溶液加回到吸附柱重复洗脱一遍。

12. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或 -80°C 保存。