

## HiPure Bacterial RNA Mini Kit

细菌 RNA 试剂盒

### 产品简介

本试剂盒适合于从革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌培养液中提取高纯度总 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，并配套的溶菌酶和酸性玻璃珠，适合于处理各种细菌中提取 RNA，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，整个提取过程只需 30~40 分钟。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern Blot、Poly A 纯化，核酸保护和体外翻译等实验。

### 产品组份

产品编号	R4181-01	R4181-02	R4181-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
gDNA Filter Mini Columns	10	50	250
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Glass Beads (0.1-0.6mm)	10 g	30 g	150 g
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
Lysozyme	20 mg	90 mg	400 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	10 ml
Buffer TE	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Buffer STL	5 ml	20 ml	90 ml
Buffer RLC	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml

版本号：2024-01

## 保存条件

本产品可在室温(15-25℃)保存 18 个月，长期保存时需置于 2-8℃。因 RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染，推荐分装保存于 2~8℃，以减少污染。

## 准备事项

- Lysozyme 的配制(50mg/ml): Lysozyme 以干粉提供，使用前须加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解，使其终浓度为 50mg/ml。溶解后，分装保存于 2-8℃或-20℃。

R4181-01	加入 0.4 ml Protease Dissolve Buffer
R4181-02	加入 1.8 ml Protease Dissolve Buffer
R4181-03	加入 8 ml Protease Dissolve Buffer

- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- **加入 DTT 或 2-巯基乙醇提高 RNA 完整性:** 按 1ml Buffer RLC/STL 加入 20 $\mu$ l 2-巯基乙醇 (或 20 $\mu$ l 1M DTT)可以提高核酸酶灭活效果，混合液可以室温放置 1 周。

## 细菌的用量和培养 (<math>1 \times 10^9</math>)

- **细菌计数:** 细菌生长情况可以通过分光光度计进行测量。由于不同仪器之机的差别和各种生长条件的影响，我们很难给出 OD 值与细菌数量之间的精确可靠的关系。例如，每毫升含  $1 \times 10^9$  个细菌的培养液，稀释 4 倍后，在 Beckman DU-40 测量时，OD600 为 0.125；在 DU-7400 测量时，OD600 为 0.25。因此我们建议使用平板计数法来较准仪器测量的 OD 值。测量 OD 值时，需对样品进行稀释或浓缩，以确保读数在 0.05-0.3 的可信区间内。不同的培养条件以及不同细菌的 RNA 含量差别很大，我们建议在初次提取时，细菌的用量为  $5 \times 10^8$ ，然后再根据结果进行调整。
- **细菌培养:** 选择合适的培养液，按 1:100 比例接种至培养液中，37℃ 振荡培养 6-10 小时，培养时间取决于细菌的生长速度，建议细菌在生长指数期间提取 RNA。

## 实验步骤 A (酶法)

该方案适合于革兰氏阴性细菌或部分革兰氏阳性细菌。

1. 取 0.5~1.8ml 处于指数期的细菌培养液 ( $<1 \times 10^9$ ) 至 2.0ml 离心管中,  $12,000 \times g$  离心 1 分钟收集细菌。倒弃培养液, 反扣于吸水纸上吸尽残液。
2. 加入 100 $\mu$ l Buffer TE 和 10~20 $\mu$ l Lysozyme (50mg/ml), 涡旋重悬细菌, 室温放置 5~15 分钟消化细菌的细胞壁。
3. 加入 500 $\mu$ l Buffer RLC/2-巯基乙醇, 涡旋 10 秒, 室温放置 5 分钟,  $12,000 \times g$  离心 1 分钟。
4. 把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中, 转移 0.6ml 上清液至柱子。  $12,000 \times g$  离心 1 分钟, 弃去 gDNA 过滤柱。
5. 加入 0.18ml 异丙醇至滤液中, 用移液器吸打混匀 3~5 次。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至柱子。  $12,000 \times g$  离心 1 分钟。
7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管, 加入 500 $\mu$ l Buffer RW1。  $12,000 \times g$  离心 1 分钟。  
DNA 过滤柱可去除 95-99% 的基因组 DNA 污染。多数应用无需进一步处理。由于 PCR 敏感高, 对单拷贝数基因也都可能被扩增, 若纯化的 RNA 用于 RT-PCR, 建议订购我司的 DNase on Column Kit(R4911)进行膜上 DNase 消化, 以彻底去除 DNA。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管, 加入 500 $\mu$ l Buffer RW2。  $12,000 \times g$  离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管, 加入 500 $\mu$ l Buffer RW2。  $12,000 \times g$  离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。  $12,000 \times g$  离心 2 分钟。
11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管, 加入 30~100 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。  $12,000 \times g$  离心 1 分钟。弃去柱子, 把 RNA 保存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。  
柱子最小的洗脱体积是 30 $\mu$ l, 若 RNA 产量超过 30 $\mu$ g, 推荐进行第二次洗脱。

## 实验步骤 B (珠磨法)

该方案采用珠磨法，适合于从各种革兰氏阴性或阳性细菌，以及难裂解的细菌中提取高产量的 RNA。

1. 取 0.5~1.8ml 处理指数期的细菌培养液 ( $1 \times 10^9$ ) 至 2.0ml 离心管中， $12,000 \times g$  离心 1 分钟收集细菌，倒弃培养液，反扣于吸水纸上吸尽残液。
2. 加入 300 $\mu$ l Buffer STL/2-巯基乙醇和一勺玻璃珠 (0.1~0.6mm) 至沉淀中，转移至涡旋仪上最高速度涡旋 10 分钟，或转移至珠磨仪进行高效珠磨。
  - 涡旋仪：推荐使用美基涡旋仪 MagMix A 或高效的水平式涡旋仪 MagMix B。这两台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。实验室常用的涡旋仪或带振荡功能的恒温金属浴也可以使用，使有恒温金属浴时需要 2ml 离心管中，让管子间的磨擦力防止管子无效旋转减少珠磨效果。
  - Powerlyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
  - FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
  - Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
3. 短暂离心，加入 500 $\mu$ l Buffer RLC/2-巯基乙醇，涡旋 5~10 秒。 $12,000 \times g$  离心 1 分钟。按方案 A 的第 4~9 步进行操作。

## RNA 完整性和纯度检测

**完整性检测：**用 0.5x TBE 电泳缓冲液配制 1.2%琼脂糖凝胶，RNA 上样量为 0.5~1.5 $\mu$ g，150V 电泳 15 分钟。电泳图上能看两条明显的 rRNA 条带，其中 28S rRNA 的亮度好明显亮于 18S rRNA，表明 RNA 条带完整不降解。

**纯度 1：**OD260/280 比值衡量蛋白质污染程度的指标。高纯度 RNA 的 OD260/280 比值为 2.0，但由于 OD260，OD280，OD230 会受到 pH 值的影响。本产品采用 RNase Free Water 溶解 (DEPC 处理水)，其 pH5.5-7.5 波动，OD260/280 比值为 1.9-2.1。

**纯度 2：**当 RNA 总量高于 10 $\mu$ g 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 $\mu$ g 时，A260/230 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3 $\mu$ g，A260/230 会低于 0.6。这是因为 Buffer RLC 和 Buffer RW1 含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值，因此 A260/230 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研发表明，低浓度异硫氰酸胍不影响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下，适量提高样品用量和裂解液用量，提高核酸浓度 (核酸总量 > 10 $\mu$ g) 时，OD260/230 可以明显改善。