

RNASafer Bacterial RNA Kit

细菌 RNA 保护和提取试剂盒

产品简介

RNASafer Bacterial RNA Kit 是专门为细菌 RNA 保存和提取而设计的。试剂盒采用阳离子表面活性剂快速作用于细菌，并让细菌内部的 RNA 处于稳定状态，使其 mRNA 表达模式不会在操作过程中发生改变。试剂盒还提供基于硅胶柱的纯化试剂，抽提过程中无需用到危险的酚氯仿抽提，也无需用到耗时的醇类沉淀，整个过程只需 60 分钟。本试剂盒适合于处理 $<1 \times 10^9$ 细菌。该方法得到的 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	R4214-01	R4214-02	R4214-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Mini Column	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
RNASafer LS Reagent	20 ml	150 ml	4 x 200 ml
Glass Beads (0.1-0.2mm)	10 g	20 g	100 g
Buffer HTL	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer GXP2	5 ml	20 ml	80 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
说明书	1	1	1

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。低温下 Buffer HTL 可能有沉淀析出，55℃温浴混匀再使用。

准备事项

- 按标签要求用无水乙醇稀释 Buffer GXP2、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 HTL 加入 20 μ l 2-巯基乙醇（或 20 μ 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 (1×10^9)

- **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 1×10^9 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 5×10^8 ，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。

操作步骤 A: 高温裂解提取细菌 RNA

该方案采用高温裂解法，适合于革兰氏阴性细菌和部分阳性细菌中快速提取 RNA。

1. 转移 1ml 的细菌培养液至 15ml 离心管中，立即加入 3ml RNASafer LS Reagent，颠倒混匀 6-8 次，室温静置 10 分钟裂解细菌细胞。

为方便操作，可以把 1ml 培养液转移至 2 个 2.0ml 离心管中。若采用 2.0ml 离心管时，第二步离心可以用 10,000 × g 离心 5 分钟。

2. 室温下，5,000 × g 离心 10 分钟收集细菌，倒弃液体，短暂离心后吸尽全部残液。处理的沉淀可直接提取，或于 -20°C 保存二周，-80°C 保存 1 个月。
3. 加入 0.4ml 裂解液 HTL/2-巯基乙醇，涡旋或吹打重悬沉淀，75°C 度温育 5 分钟，12,000 × g 离心 5 分钟。

按 1ml 裂解液 HTL 加入 20μl 2-巯基乙醇、20μl 1M DTT 或 1M TCEP，该混合液室温可以保存一周。

4. 转移 0.3ml 上清液至新离心管中，加入 0.45ml 结合液 GXP2 至上清液，吸打混匀 3-5 次。

结合液 GXP2 使用前按标签要求加乙醇进行稀释。

5. 把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中，转移 0.6ml 上清液至柱子。12,000 × g 离心 1 分钟，弃去 gDNA 过滤柱。

6. 加入 0.18ml 异丙醇至滤液中，用移液器吸打混匀 3~5 次。

7. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至柱子。12,000 × g 离心 1 分钟。

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500μl Buffer RW1。12,000 × 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 剪敏感高，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。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500μl Buffer RW2。12,000 × g 离心 1 分钟。

10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 500μl Buffer RW2。12,000 × g 离心 1 分钟。

11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。

12. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~100μl 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°C 。
柱子最小的洗脱体积是 $30\mu\text{l}$ ，若 RNA 产量超过 $30\mu\text{g}$ ，推荐进行第二次洗脱。

实验方案 B：珠磨法提取细菌 RNA

该方案采用珠磨法，适合于从各种微生物培养液，食品发酵液，体液样品中提取高产量细菌 RNA。

1. 转移 1ml 的细菌培养液至 15ml 离心管中，立即加入 3ml RNASafer LS Reagent，颠倒混匀 6-8 次，室温静置 10 分钟裂解细菌细胞。

为方便操作，可以把 1ml 培养液转移至 2 个 2.0ml 离心管中。若采用 2.0ml 离心管时，第二步离心可以用 $10,000 \times g$ 离心 5 分钟。

2. 室温下， $5,000 \times g$ 离心 10 分钟收集细菌，倒弃液体，短暂离心后吸尽全部残液。处理的沉淀可直接提取，或于 -20°C 保存二周， -80°C 保存 1 个月。

3. 加入 0.45ml 裂解液 HTL/2-巯基乙醇，涡旋重悬沉淀，转移至 2.0ml 离心管或螺口离心管中。

按 1ml 裂解液 HTL 加入 $20\mu\text{l}$ 2-巯基乙醇、 $20\mu\text{l}$ 1M DTT 或 1M TCEP，该混合液室温可以保存一周。采用珠磨仪或水平转子的涡旋仪时，建议使用螺口冻存管，以防止液体泄漏。

4. 加入 1 勺玻璃珠 (0.1-0.6mm)，转移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 30-60 秒。

- 涡旋仪：推荐使用美基涡旋仪 MagMix A，这台涡旋仪带 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。
- 使用前，按 1ml 裂解液 HTL 加入 $10\mu\text{l}$ 2-巯基乙醇，该混合液室温可以保存一周。

5. 65°C 温育 5 分钟， $12,000 \times g$ 离心 5 分钟。

6. 转移 0.3ml 上清液至离心管中，加入 0.45ml 结合液 GXP2，涡旋混匀 5 秒。

7. 按方案 1 的第 5-12 步进行操作。