

细菌总 RNA 试剂盒说明书

产品组成

细菌总 RNA 试剂盒 Cat. No.	5 次样品 5005005	50 次制备 5005050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
RNase-free 1.5 ml 收集管	5 个	50 个
溶菌酶	60 mg	600 mg
Buffer L	3 ml	25 ml
Buffer WA (浓缩液)	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR (浓缩液)	1.5 ml	10 ml
RNase-free Water	1.5 ml×2	30 ml
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

溶菌酶请置于 2-8°C 贮存，其他试剂和物品如果储存于常温（0~30°C），可在两年内保持使用性能无明显变化。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品适合从 $\leq 2.0 \times 10^9$ 细菌培养物中分离纯总 RNA。细菌经溶菌酶破壁后，被裂解液溶解并释放 RNA。将含有 RNA 的滤液加入纯化柱，RNA 结合在纯化柱上，溶解的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去。RNA 经两种洗液洗涤后，用 RNase-free Water 洗脱，即可用于 RT-PCR，Northern blot，Dot blot，mRNA 分离等各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇和 70% 乙醇
2. RNase-free 1.5 ml 离心管
3. 移液器及吸头（建议选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 旋涡振荡器和台式少量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 无 RNA 酶使用的实验室

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
2. 将水浴锅温度设置到 37°C。
3. 根据一次提取的细菌标本数（按每个标本需加 100 μ l 溶菌酶溶液计算）配制适量的 100 mg/ml 的溶菌酶溶液：比如要提取 6 个标本的细菌基因组 DNA，则称取 60 mg 溶菌酶干粉，加入 600 μ l RNase-free Water 配制成 600 μ l 溶菌酶溶液。

注意：反复冻融溶菌酶溶液对其活性影响极大，如果一次配制了较多的溶菌酶溶液，应分装成小份于 -20°C 储存，解冻使用后的溶菌酶溶液如有剩余，应予以丢弃，不可再次冻存。

4. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
5. 因唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在 RNA 提取的全过程中都戴乳胶手套和口罩。
6. 若后续实验需要彻底除去 DNA，请增加 DNase I 消化步骤，DNase I 柱上消化试剂盒（Simgen, Cat.No.: 8010050）需自行购买。

操作步骤：

1. 用 1.5 ml 离心管收集 $\leq 2.0 \times 10^9$ 细菌培养物，加入 100 μ l RNase-free Water，旋涡振荡充分悬浮细菌。

* 1.0×10^9 细菌相当于 1 ml OD600=1 的细菌培养物中的细菌数量。

* 某些二价阳离子会抑制溶菌酶的活性，如果细菌培养基中含有二价阳离子（如 MRS 培养基等），应在离心收集细菌后增加一次洗涤步骤：加入 1 ml 蒸馏水，旋涡振荡悬浮细菌后 12000 rpm 离心 30 秒，弃蒸馏水上清，再加入 100 μ l RNase-free Water，旋涡振荡充分悬浮细菌。

* 某些特殊细菌培养后会改变培养基 pH 值（如乳酸杆菌），会抑制溶菌酶的活性，在离心收集细菌后也需要洗涤一次，方法同上。

* 细菌收集方法：12000 rpm 离心 30 秒收集 1~2 ml OD600=1 的细菌培养物中的细菌，弃培养基。

2. 加入 100 μ l 溶菌酶溶液，旋涡振荡约 15 秒混匀，37°C 水浴 30-60 分钟。

* 大部分细菌水浴 30 分钟后已经充分破壁，但是某些细胞壁较厚的细菌（比如金黄色葡萄球菌）需要处理 1-2 小时才能完全破壁。请根据不同类别的细菌适当调整水浴时间。

3. 轻弹管壁使细菌悬浮起来，加入 400 μ l Buffer L，旋涡振荡直至细菌全部溶解，溶液呈透明状。

4. 将细菌的溶解物全部转移到过滤柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 2 分钟。

* 勿省略本步骤，否则可能导致后续的操作步骤中堵塞纯化柱。

* 如果溶解物不能全部滤过过滤柱，说明细菌使用过量。此时应吸取 300 μ l 滤液转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，再加 300 μ l 70% 乙醇到 1.5 ml 离心管中并用吸头吸注 6-8 次混合均匀，然后将全部混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。过滤柱及残余的滤液则丢弃不用，然后直接进入步骤 7 的操作。

5. 弃过滤柱，向滤液中加入 600 μ l 70% 乙醇并直接用吸头吸注 6~8 次混合均匀，吸取 600 μ l 混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 加入 70% 乙醇混合后如果有沉淀产生，请将沉淀一起加入到核酸纯化柱中。

6. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，吸取剩余的混合液加入到核酸纯化柱中，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

7. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 μ l Buffer WBR，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

9. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 RT-PCR 效果。

10. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个新的 RNase-free 1.5 ml 收集管中，在纯化柱的膜中央加入 50~100 μ l RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

11. 弃纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 -70°C 以下备用。