

产品概述

Bacteria RNA Extraction Kit为针对原核生物(包括革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌)RNA提取优化的试剂盒。本试剂盒包括含有优化缓冲体系、螯合剂及温和蛋白变性剂等成分的Bacteria RNA Plus Reagent, 以及能高效抑制内源性RNA酶、促进蛋白变性的RNA isolater Total RNA Extraction Reagent。两者配合使用, 可大幅度提高原核生物RNA提取产量, 同时保证良好的产物质量。提取细菌RNA时, 只需在常规操作前加一步高温预处理, 无需机械破碎或酶解步骤, 即可得到高质量及产量的细菌总RNA。本试剂盒也适用于酵母等真菌(非孢子)总RNA的提取。

产品组分

组 分	R403-01 (100 rxns)
Bacteria RNA Plus Reagent	20 ml
RNA isolater Total RNA Extraction Reagent	100 ml

保存条件

RNA isolater Total RNA Extraction Reagent, 2 ~ 8℃避光保存, 根据不同的目的地调整运输方式。

Bacteria RNA Plus Reagent, 15 ~ 25℃保存, 室温运输。如果试剂在存放过程中有沉淀析出, 请于65℃加热片刻溶解并混匀。

适用范围

1 - 5 ml菌液(<1.0 × 10⁹个革兰氏阴性菌及革兰氏阳性菌)。

注意事项

本产品中含有苯酚, 具有毒性和腐蚀性, 使用时应穿戴防护物品, 如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不慎接触到眼睛, 应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗; 接触到皮肤, 请立即用大量去垢剂和水冲洗, 如仍有不适, 请前往医院治疗。

自备材料

恒温水浴锅/金属浴、冷冻离心机、涡旋振荡器(漩涡混合器);

RNase-free枪头和RNase-free 1.5 ml离心管;

氯仿、异丙醇、75%乙醇(RNase-free ddH₂O配制)、RNase-free ddH₂O。

实验流程

步骤一: Bacteria RNA Plus Reagent处理

- 在合适的培养液中接种目的原核细胞。
- 在合适的温度环境下摇菌至细胞对数生长期, 生长超过对数生长期的细胞将不适于RNA提取, 建议重新接种细胞。
- 预热水浴锅至95℃, 预冷冷冻离心机至4℃。
- 转移1 - 1.5 ml菌液(细胞个数可达10⁹数量级)至预冷的离心管。
- 4℃ 10,000 rpm(9,600 × g)离心3 min沉降细胞。
 - ▲在此期间可将实验需要量的Bacteria RNA Plus Reagent试剂放入95℃水浴锅预热。
 - ▲请勿整瓶反复加热, 易使产品性质趋于不稳定。
- 离心完毕后, 弃掉上清, 用200 μl预热的Bacteria RNA Plus Reagent试剂吹打重悬细胞。
 - ▲如果细胞量不足5 × 10⁷, 可使用100 μl Bacteria RNA Plus Reagent试剂处理。
- 95℃水浴4 min。
 - ▲细胞管数较多时, 请尽量严格控制处理时间, 过短的处理时间(如小于3 min)可能导致细胞裂解不充分, 但处理不要超过5 min。
- 处理后的细胞悬液中加入1 ml RNA isolater Total RNA Extraction Reagent试剂, 用移液器吹打混匀, 冰上放置5 min。

步骤二：总RNA提取

1. 向以上裂解液中加入1/5体积预冷的氯仿。用手摇匀，涡旋振荡15 sec，成乳浊液，冰上或4℃静置5 min。
2. 4℃ 12,000 rpm(13,800 × g)离心15 min。
 - ▲ 必须低温离心，否则产物会有少量基因组污染。
3. 小心取出离心管。此时溶液分为三层：无色的上层、白色中间层以及红色的下层。小心吸取上层水相至一个新的离心管中。
 - ▲ 上层体积约占总体积的60%。建议吸取600 μl，不要吸的太完全，以防吸到中间层导致基因组污染。
4. 加入等体积预冷的异丙醇，上下颠倒混匀。-20℃静置10 min。
5. 4℃ 12,000 rpm(13,800 × g)离心10 min。通常可以看见白色沉淀。
6. 小心弃去上清，加入1 ml预冷的RNase-free ddH₂O配制的75%乙醇。充分洗涤管盖和管壁，并轻弹管底，让沉淀悬浮起来，4℃或冰上静置3 - 5 min。
7. 4℃ 12,000 rpm(13,800 × g)离心5 min。弃去上清。
 - ▲ 为减少杂质残留，应尽可能的将上清弃干净。建议弃去大部分上清后，短暂离心将所有液体甩至管底，再用移液器将剩余液体吸掉。
8. 在洁净的环境中室温敞口干燥沉淀2 - 5 min。注意不可过分干燥，否则会导致RNA难以溶解。
9. 加入适量的RNase-free ddH₂O溶解沉淀，轻轻吹打至沉淀完全溶解。待完全溶解后，取少量检测，其余在-80℃保存。

步骤三：产物检测

◇ 完整性检测

1. 取1 μl RNA至8 μl TE中，加入1 μl 10 × DNA loading buffer，混匀。
2. 进行1%琼脂糖凝胶电泳。原核生物可看到清晰的23S/16S核糖体RNA两条带，5S条带微弱，证明RNA完整性较好。

◇ 纯度及浓度检测

1. 用TE稀释RNA，使用分光光度计检测230 nm、260 nm、280 nm OD值，并计算OD₂₆₀/OD₂₈₀和OD₂₆₀/OD₂₃₀。纯的RNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀比值应在1.8 - 2.2之间。若OD₂₆₀/OD₂₈₀小于1.8，可能有DNA或蛋白残留；若OD₂₆₀/OD₂₈₀小于1.6，可能RNA干燥过度。OD₂₆₀/OD₂₃₀比值应在2左右，过低则提示有机溶剂残留，75%乙醇洗涤不够充分。
2. RNA浓度(ng/μl) = OD₂₆₀ × 稀释倍数 × 40。

预期产量

以革兰氏阴性菌大肠杆菌为例，使用Bacteria RNA Extraction Kit，1.5 ml对数期细胞(OD₆₀₀=1.0, 1.5 × 10⁸细胞个数)RNA产量大于30 μg，对于革兰氏阳性菌枯草杆菌，相同细胞数量的RNA产量大于20 μg。使用提取的RNA产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，显示清晰分明的16S和23S核糖体RNA条带，23S条带略深一些，5S核糖体RNA条带极弱。

常见问题与解决方案

◇ RNA产量偏低

- ①裂解不够完全或起始菌量低于要求起始量，可适当增加起始菌量，或延长处理时间至5 min。
- ②RNA沉淀未完全溶解，可在60℃加热5 min充分溶解RNA。

◇ RNA降解

- ①使用Bacteria RNA Extraction Kit高温处理细菌数分钟不会引起RNA降解，加入RNA isolater Total RNA Extraction Reagent后可与游离出来的RNA充分接触，保护RNA不受降解。分离出水相后的处理过程如果存在RNase则可能引起降解，因此请务必在整个实验过程中使用RNase-free的枪头及离心管，使用RNase-free ddH₂O配制试剂及溶解RNA，保证操作区域的清洁，减少RNA降解的可能。
- ②某些原核细菌如枯草杆菌内源性RNase含量较高，难以完全灭活，如果发现产物有部分降解，可适量降低起始菌量，使用200 μl处理液，严格按照标准操作流程进行实验，全程保持低温操作，并以熟练的操作手法尽量缩短不必要的操作时长。

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。