天净沙系列

CAT#:241025

常温运输及保存

天净沙

分枝杆菌 RNA 纯化试剂盒(过柱法)

Mycobacterium RNA Purification Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

分枝杆菌属（*Mycobacterium* spp.）是极为古老的细菌，与人类的疾病相关的就有25 种以上，包括引起结核病的结核分枝杆菌（*Mycobacteria tuberculosis*）。近年来由于多重耐药性分枝杆菌的出现，分枝杆菌再次成为人们关心的细菌。PCR 快速诊断是目前检测分枝杆菌的主流方法，但由于此类细菌具有十分独特的坚硬的细胞壁，快速提取其基因组 RNA 一直是十分棘手的技术问题。为了解决这一难题，我们公司开发了一款分枝杆菌 RNA 纯化试剂盒。它具有下列特点:

1. 柱式操作，更加简单快捷，整个过程只需要约 30 分钟。
2. RNA 纯度高，$OD_{260/280}$一般都在 2.0 左右，可直接用于 RT-PCR、 Northern 杂交、microarray hybridization、 cDNA 合成等实验。
3. 价廉物美，与国外同类产品相比质量相当，但价格便宜。
4. 本产品足够 50 次微量 RNA 纯化实验。
5. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用大扁盒包装

成份	编号	规格	包装
分枝杆菌 RNA 纯化溶液 A	241025a	20 mL	30 mL 本色瓶
分枝杆菌 RNA 纯化溶液 B	241025b	25 mL	30 mL 棕玻瓶
分枝杆菌 RNA 纯化溶液 C	241025c	75 mL	125 mL 本色瓶
分枝杆菌 RNA 纯化溶液 D	241025d	25 mL	30 mL 本色瓶
离心吸附柱	220144	50 套	塑料袋
通用洗柱液	220143	50 mL	60 mL 本色瓶
RNA 洗脱液	971207	10 mL	10 mL 本色瓶
使用手册	241025sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，有效期一年。

自备试剂

TE 缓冲液，蒸馏水，化痰液干粉，氯仿

使用方法

一: 培养的分枝杆菌样品的预处理

1. 刮取培养皿培养的分枝杆菌到 0.5 mL 自备 TE 缓冲液中。
2. 80℃放置 20 分钟以杀灭分枝杆菌。
3. 3,000× g 室温离心 15 分钟，弃上清。
4. 将分枝杆菌沉淀放-20℃冰箱备用或直接进入到第三步的分枝杆菌基因组 RNA 提取步骤。

二: 含分枝杆菌的痰液样品的预处理

1. 将痰液样品(0.5 mL-2 mL)加入到干净的 10 mL 或 15 mL 塑料离心管中。
2. 加 2 mL 的自备蒸馏水。
3. 再加入 100 mg 自备的化痰液干粉。（可另购本公司化痰液干粉，CAT#:220142d）
4. 充分混合均匀后室温放置 15-30 分钟。如果痰很浓，可以延长保温时间 30 分钟。
5. 3,000×g 室温离心 15 分钟，弃上清。
6. 将分枝杆菌沉淀放-20℃冰箱备用或直接进入到第三步的分枝杆菌基因组 RNA 提取步骤。

三: 分枝杆菌基因组 RNA 的提取

1. 向上述装有分枝杆菌沉淀的离心管中加入 0.4 mL 分枝杆菌 RNA 纯化溶液 A 并充分吹打混匀。如果分枝杆菌 RNA 纯化溶液 A 存放时产生沉淀，请置于 65℃融化，用前充分摇晃均匀。
2. 加入 0.4 mL 分枝杆菌 RNA 纯化溶液 B，剧烈振荡 30 秒。
3. 65℃保温 5 分钟。
4. 室温 12,000-15,000×g 离心 3-5 分钟。
5. 转移上清到一干净的 1.5 mL 塑料离心管中。
6. 再加入 0.1 mL 分枝杆菌 RNA 纯化溶液 B 和 0.1 mL 自备氯仿，振荡混匀 30 秒。
7. 室温 12,000-15,000×g 离心 3-5 分钟。
8. 转移上清到一自备的、干净的 5 mL 塑料离心管中。
9. 加入相当于上清 3 倍体积的分枝杆菌 RNA 纯化溶液 C（约 1.2-1.5 mL）和 1 倍体积的溶液 D（约 0.4-0.5 mL），充分混匀。
10. 将混合液（约 2.5 mL）分 3-4 次转移到离心吸附柱中。每次 13,000-15,000×g 室温离心半分钟，弃收集管中的穿透液。
11. 用 0.5 mL 通用洗柱液到离心吸附柱中，室温离心半分钟，弃收集管中的穿透液。
12. 一次洗涤一般足够去除杂质。但如果样品 $OD_{260/280}$ 比值不高，可以再用 0.5 mL 通用洗柱液重复此步一次。
13. 室温离心半分钟。此步十分重要，否则残留的洗柱液会影响 RNA 的使用。
14. 将离心吸附柱转移到一自备的 RNase-free 1.5 mL 塑料离心管中，加入 30-100 μL RNA 洗脱液。
15. 室温离心半分钟，离心管中溶液即为 RNA 样品，可以立即使用或存放于-80℃待用。
16. RNA 完整性的电泳检测：如果需要做 Northern 杂交，强烈建议用户使用甲醛变性胶进行 RNA 电泳。

	17. RNA 产量产率测定：将 5-10 μL RNA 溶于 TE 缓冲液中(pH 7.5-8.2 之间)检测其在 OD_{260} 的光吸收。通过光吸收可以得出 RNA 浓度(1 OD260 的 RNA=40 μg/mL)，进而计算出 RNA 的产量(浓度×体积)和产率(RNA 产量/分枝杆菌用量)。注意不要将 RNA 稀释在 DEPC 水中检测 OD_{260} 和 OD_{280}，否则光吸收比在 TE 中测得的低 10%-15%。 18. RNA 纯度测定：无污染的总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 一般在 1.8-2.1 之间(具体数值与其碱基组成和溶液成分等多种因素有关)，OD_{260}/OD_{230} 一般在 2.0-2.3 之间，如果低于或高于此范围则分别表示样品可能有蛋白质或多糖的污染，但一般不影响 RT-PCR 等反应。蛋白质污染可以通过酚/氯仿抽提一次然后酒精沉淀去除，DNA 和多糖污染可以分别用多糖清除剂去除。测 OD 时 RNA 不能过度稀释使 OD 读数低于仪器的有效范围，如果低于一起的检测范围，该读数无效。
关联产品	分枝杆菌 DNA 纯化试剂盒