天净沙系列

CAT#:220620

常温运输，4℃保存

天净沙

细菌 RNA 纯化试剂盒（沉淀法）

Bacterial 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

本产品是在根据细菌特点设计的细菌总 RNA 提取试剂盒。它基于异硫氰酸胍/酚/氯仿提取 RNA 原理，可用于包括 *E.coli*、*Campylobacter fetus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Rhodobacter sphaeroides* 等各种常见的革氏阴性细菌。如果需要提革氏阳性细菌（如 *Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus* 等）的 RNA，可以选择本公司的真菌 RNA 纯化试剂盒。本产品特点如下:

1. 操作简单快速，只要十分钟左右,可以全在室温下进行。
2. 所得 RNA 质量高，OD260/OD280 一般在 1.9，基因 DNA 污染低。
3. 灵敏度高，可以从一个菌落中提取到普通电泳能够检测到的总 RNA。
4. 性价比高于进口同类产品。
5. 本产品足够 100 次微量提取。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
细菌 RNA 纯化溶液	220620	100 mL	100 mL 棕玻瓶
使用手册	220620sc	1 份	1 份

运输及保存

常温运输，4℃保存，有效期一年。

自备试剂

氯仿，异丙醇，75%乙醇，RNA 溶解液

使用方法

1. 在 1.5 mL 塑料离心管中离心收集 0.2-1.5 mL 新鲜细菌(注意:由于细菌 RNA 半衰期十分短，所以必须使用最新鲜细菌)，吸尽液体培养基，加入 1 mL 细菌 RNA 纯化溶液并用枪充分吹打，确保细菌全部裂解并且没有块状物。如果使用菌落，则用接种环小心将其转移到装有 1 mL 细菌 RNA 纯化溶液的 1.5 mL 塑料离心管中，用移液枪吹打均匀。在细菌数较少时，建议使用核酸助沉剂以提高 RNA 回收率。
2. 加入 0.2 mL 氯仿，在振荡器上充分振荡混均 30 秒（必须将管底的液体振荡起来，否则不能有效将 DNA 打断和去除蛋白质)。
3. 14,000×g 室温离心 3 分钟。上清液无色，下层液呈篮色，中间为蛋白质。小心将上清液转移到另一干净 1.5 mL 塑料离心管中，上清液体积约为 0.6 mL。为避免触及中间层的 DNA 和蛋白质，建议分小量多次吸取，并且只取 0.5 mL，留 0.1 mL 左右不取。当细菌数量较少时，中间层将十分松散，上清时很容易吸到下层有机相，需要更加小心。
4. 在上清液中加入等体积的异丙醇，振荡器上振荡混均 30 秒。

5. 14,000×g 室温离心 3-10 分钟，RNA 将在管底侧面形成沉淀。

6. 小心吸弃上清液，注意不要吸弃 RNA 沉淀。

7. 在离心管中加入 1 mL 75%乙醇，振荡器上振荡混均 30 秒。

8. 14,000×g 室温离心 1 分钟。

9. 小心吸弃上清液，注意不要吸弃 RNA 沉淀。

10. 短暂快速离心，用移液枪小心吸弃残留液（约 50 μL)。

11. 室温开盖短暂放 1-2 分钟后加入适量 RNA-free 水使 RNA 沉淀溶解。所得 RNA 溶液可以立即使用或存放于-80℃长期保存。

12. 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，因为非变性胶不能分离所有的 RNA 分子。如果是简单检测，可以使用 TAE 电泳液，但文献报道必须使用变性上样液。普通 DNA 上样液不含变性剂，也没经过去 RNase 处理,所以最好不要使用。尤其需要注意的是不要使用 TBE 进行 RNA 电泳,因为 TBE 所含硼酸是研究多糖的经典方法----硼酸络合法中的关键成分，硼酸通过与 RNA 核糖中的羟基发生络合反应，形成 RNA 分子内或 RNA 分子间的络合复合物，使同样长度的 RNA 具有不同的泳动速度，电泳条带弥散，同时有大的 RNA 络合复合物迟留在加样孔中（一般会误以为是基因组 DNA 污染)。RNA 分子内或 RNA 分子间的络合物的形成的多少和比例又与硼酸与 RNA 的数量比例有关，而 RNA 样品中污染的其他多糖（如植物中提取的 RNA）也会参与此反应，使硼酸对 RNA 电泳的影响更复杂，所以 TBE 对 RNA 电泳的影响没有规律性和重复性。有的样品可以使用有的又不行，最好是避免使用。

由于细菌细胞中 70-80%的 RNA 为 rRNA，后者又由 23S (约 3700 nt)，16S (约 1700 nt)和 5S (约 100 nt)三种组成，所以变性胶电泳后应该在 UV 下看见三条清晰的 rRNA 带。由于核酸长度与结合 EB 的数量成正比（当然还与 RNA 的二级结构有关，双链部分结合能力比单链部分强)，所以 23S rRNA 条带的荧光强度一般比 16S rRNA 条带的荧光强度强 2 倍。如果这两条 rRNA 带不清晰或比例小于此范围则表示 RNA 有降解（因为大的 RNA 被酶降解的可能更大)。

13. 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 OD260 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 的产量和产率。注意不要将 RNA 稀释在 DEPC 水中检测 OD260 和

	OD280，否则光吸收比在 TE 中测得的低 10%-15%，因为核酸光吸收跟溶液 pH 相关，而 DEPC 水中的 DEPC 高压分解后产生的 CO_2 与水反应生成碳酸，使溶液 pH 降低进而降低 RNA 的光吸收。 14. RNA 纯度测定： 无污染的总 RNA 的 OD260/OD280 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)，OD260/OD230 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 DNA 清除剂和 PS 清除剂去除。
关联产品	细菌 RNA 纯化试剂盒（过柱法）