

## HYCEZMBIO® Plus Bacteria RNA Kit (gDNA-Filter)

## 细菌 RNA 提取试剂盒 (gDNA 清除柱)

## 目录号

RHYC22 (50 preps)

## 试剂盒组成

Component	RHYC22(50 preps)
Buffer RL	30 ml
70%乙醇	9 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
Buffer RW1	25 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
RNase-free H <sub>2</sub> O	10 ml
gDNA-Filter Columns with Collection Tubes	50
Spin Columns RA with Collection Tubes	50
Buffer TE	10 ml

## 保存方法

室温 (15-30°C) 保存。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

---

## 产品介绍

独特的裂解液迅速裂解细菌并灭活细胞 RNA 酶，使用 gDNA-Filter Columns 去除基因组 DNA，然后用 70%乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下特异性吸附于硅基质膜，再通过两步漂洗步骤，将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。提取的 RNA 纯度极高，质量稳定可靠，可直接用于 RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译和分子克隆等多种下游实验。

## 产品优势

1. 不使用苯酚氯仿，安全无异味。
2. 使用 gDNA-Filter Columns 直接有效去除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化。多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值 1.9-2.2，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot、测序等各种实验。

## 注意事项

1. 使用 RNase-free 的离心管和吸头；避开经常使用 RNase 的区域，以免 RNase 气溶胶污染。
2. 提取的样品避免反复冻融，否则影响 RNA 提取得率和质量。
3. 第一次使用 70%乙醇和 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。
4. 用户需自备无水乙醇和溶菌酶。

## 操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

提取细菌 RNA 需先用试剂盒中的 Buffer TE 配制溶菌酶缓冲液，浓度为 1-3 mg/ml。

1. 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 min 收集菌体（菌体最大量不超过  $1 \times 10^9$  细胞）到一个 1.5 ml 离心管，小心去除所有上清，防止残余培养基上清对细胞壁消化过程产生抑制。
2. 用含有溶菌酶的 100  $\mu$ l TE 缓冲液重悬菌体（TE 中加入溶菌酶，浓度为 1-3 mg/ml），室温放置 5 min 溶解细胞壁，期间涡旋混匀数次帮助破壁。破壁完成后 12,000 rpm 离心 30 s 收集菌体细胞到管底，吸弃上清。

**注意：**1）一般 G-菌使用 1 mg/ml 溶菌酶缓冲液足够，甚至可以省略破壁步骤。2）一些 G+菌难破壁需要提高溶菌酶浓度（15 mg/ml）、延长破壁时间（10 min），或者联合使用石英砂机械破壁，蛋白酶 K 消化等方法。对于金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌等葡萄球菌破壁时，还应加入溶葡萄球菌酶 (lysostaphin) 至 1 mg/ml, 37°C 孵育 15 min 帮助破壁。

3. 向菌体沉淀中加入 500  $\mu$ l Buffer RL，用移液器吸打或涡旋震荡至菌体溶解消失，充分裂解。

**注意：**一般加入 Buffer RL 涡旋吸打后菌体会全部溶解，如果有不溶性沉淀，可 12,000 rpm 离心 1 min，吸取上清进行下一步操作。

4. 将裂解混合物转移到已装入收集管的 gDNA 清除柱 (gDNA-Filter Columns) 中，12,000 rpm
-

离心 1 min, 弃掉 gDNA-Filter Columns, 保留滤液 (RNA 在滤液中)。

5. 加入与滤液等体积的 70%乙醇 (通常为 500  $\mu$ l, 使用前检查是否已加入无水乙醇), 反复拍打混匀 (此时可能会出现沉淀), 将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns RA) 中, 若一次不能将全部溶液加入吸附柱中, 请分两次转入。12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
  6. 向吸附柱 RA 中加入 500  $\mu$ l Buffer RW1, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
  7. 向吸附柱 RA 中加入 600  $\mu$ l Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
  8. 重复步骤 7。
  9. 将吸附柱放回空收集管内, 12,000 rpm 离心 2 min, 将吸附柱 RA 置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。  
**注意: 这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇, 乙醇残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。**
  10. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 30-50  $\mu$ l RNase-Free H<sub>2</sub>O, 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 得到 RNA 溶液, -70°C 保存, 防止降解。  
**注意: RNase-Free H<sub>2</sub>O 体积不应少于 30  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。如果要提高 RNA 的产量, 可用 30-50  $\mu$ l 新的 RNase-Free H<sub>2</sub>O 重复步骤 10; 如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 10。**
-