



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@163.com

RealPure Bacterial RNA Extraction Kit

RealPure 细菌 RNA 提取试剂盒

● 试剂盒内容及保存:

试剂盒组成	RTR2307-01 (50 次)	贮存方式
TE pH8.0	10 ml	常温
溶菌酶	50 mg 首次使用按照标签加入 TE pH8.0	4℃ 加入 TE 后-20℃贮存
裂解液 RL	30 ml	常温
去蛋白液 RD	30 ml	常温
漂洗液 RW (浓缩液)	25 ml 首次使用按照标签加入无水乙醇	常温
RNase-free 水	5 ml	4℃
DNA 清除柱 CS (RNase-free)	50 个	常温
RNA 吸附柱 CR (RNase-free)	50 个	常温
收集管	100 个	常温
2 ml 离心管 (RNase-free)	50 个	常温
1.5 ml 离心管 (RNase-free)	150 个	常温
说明书	1 份	

● 储存条件和效期:

RNase-free 水和溶菌酶 4℃ 保存; 其他试剂在常温 (25℃ 左右) 干燥条件下, 可保存 1 年。试剂盒常温运输。

● 产品简介:

本试剂盒适用于快速提取细菌总 RNA, 使用 DNA 清除柱 CS 确保有效滤除 gDNA 残留, 不需要使用 DNase 消化, 得到的 RNA 可直接用于反转录 PCR, 荧光定量 PCR。

● 准备工作:

- 1 操作前在裂解液 RL 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%, 如 500 μ l RSL 中加入 5 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RSL 4℃ 可放置 3 天。
- 2 按照标签所示在漂洗液 RW 中加入无水乙醇 (自备), 混匀后盖紧瓶盖后常温贮存备用。
- 3 按照标签所示在溶菌酶中加入 TE 溶液, 混匀溶解后-20℃ 贮存。
- 4 所有离心步骤均在常温下进行。

● 操作步骤:

1. 样品处理和裂解:

注: 本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。

中科瑞泰(北京)生物科技有限公司 电话:400-699-0631 E-mail:real-times@vip.163.com <http://www.real-times.com.cn>

1.1 1-2 ml 菌液(约 10^8 - 10^9 细胞)加入到 1.5 ml 离心管中, 13000 rpm 离心 2 分钟, 弃上清, 离心快甩, 用移液器吸头尽可能吸尽上清(如果培养基上清去除不完全, 将对细胞壁的酶解消化过程产生抑制)。

注: *E.coli* 菌株 $OD_{600} = 0.5$ 相当于 1×10^9 个细菌。

1.2 菌体中加入 100 μ l 酶溶液, 涡旋震荡 20 秒, 按照下表处理。

细菌种类		酶溶液	处理	
革兰氏阴性菌	大肠杆菌	1 mg/ml 溶菌酶 TE 溶液	常温 5 min	10mg/ml 溶菌酶用 TE 稀释 10 倍
革兰氏阳性菌	枯草杆菌	10 mg/ml 溶菌酶 TE 溶液	常温 15 min	试剂盒配套
	金黄色葡萄球菌	1mg/ml 溶葡萄球菌酶 (lysostaphin)	37°C 15 min	自备

注: 不同细菌破壁难易程度不同, 客户根据细菌种类选择合适的酶种类和破壁程序。

1.3 酶解后的菌体中加入 500 μ l 裂解液 RL (使用前请先检查是否已加入 β -巯基乙醇), 混匀。

2. 离心得到上清 (可选步骤):

若没有不溶性沉淀, 直接进行步骤 3。如有不能裂解的碎片或者不溶物, 13,000 rpm 离心 5 min, 取裂解物上清进行下一步。

3. 去除基因组污染和洗脱 RNA:

将 DNA 清除柱 CS 放入一干净的 2 ml 离心管内, 用移液器小心将步骤 2 离心管内的溶液或离心后的上清全部转移到 DNA 清除柱 CS 中, 13,000 rpm 离心 2 分钟 (**RNA 在离心管滤液中, 不要丢弃**)。

注: 确保全部溶液都收集到 2 ml 离心管中, 如果膜上有残留液体, 延长离心时间至 5 分钟, 保证膜上无残留液体。

4. RNA 挂柱:

向 2 ml 离心管滤液中加入 0.5 倍体积的无水乙醇 (如滤液体积为 500 μ l, 加入 250 μ l 无水乙醇), 此时可能会出现沉淀, 立即混匀, 不要离心。将全部溶液加入到 RNA 吸附柱 CR 中 (吸附柱放入收集管中), 13,000 rpm 离心 1 分钟。

注: 确保溶液全部过滤到收集管中, 膜上无残留, 如有必要, 可以延长离心时间至 5 分钟。

5. 去除 RNA 中的蛋白污染:

向 RNA 吸附柱 CR 中 (吸附柱放入收集管中) 加入 500 μ l 去蛋白液 RD, 13,000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液。

6. 去除 RNA 中的其他杂质:

向 RNA 吸附柱 CR 中加入 700 μ l 漂洗液 RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 13,000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液。

7. 进一步去除 RNA 中的其他杂质:

向吸附柱 CR 中加入 500 μ l 漂洗液 RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 13,000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液。

8. 关键步骤: 彻底去除吸附柱上的残余乙醇:

将吸附柱 CR 放回收集管中，确保盖好吸附柱管盖，13,000 rpm 将吸附柱 CR 空甩离心 2 分钟，去除吸附柱上的残余液体。

注：此步骤目的是将吸附柱中残余漂洗液去除，如果有漂洗液残留，可能会影响后续的 RT 等实验操作。

9. 洗脱得到 RNA:

将 RNA 吸附柱 CR 转入一个新的 1.5 ml RNase-free 离心管中，向吸附柱 O 型垫圈中央悬空加入 50-100 μ l RNase-free 水（事先 65 $^{\circ}$ C 预热可提高洗脱效率），盖好吸附柱管盖，常温放置 2 分钟，13,000 rpm 离心 2 分钟。

注：确保水要加到膜的中央，不要贴壁加入；洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ l，体积过小影响回收效率。

10. RNA 贮存:

RNA 样品-80 $^{\circ}$ C 中保存。

● RNA 产量和质量的评估:

1. RNA 产量:

用分光光度计测定 OD₂₆₀ 的吸光值来计算 RNA 产量。将 RNA 按照一定的比例稀释于 TE 溶液（10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA）中，根据以下公式计算：

$$A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 = \mu\text{g RNA/ml}$$

注：测定 OD 值时，尽量不要用 RNase-free 水稀释 RNA，因为 RNase-free 水 pH 较低，测定的 OD 值偏低。

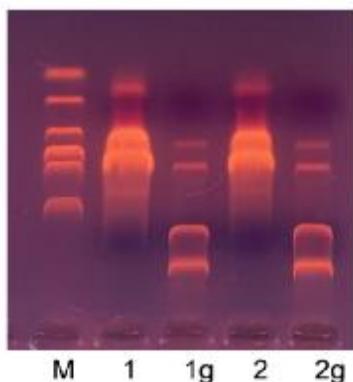
大肠杆菌 DH5 α RNA 得率为 20-30 μ g/ml 菌液 OD₆₀₀=0.5

2. RNA 质量:

凝胶电泳检测：凝胶电泳中，细菌的完整 RNA 应该有两条主带：26S 和 13S，并且 26S 亮度应该与 13S 相当或是其亮度的 2 倍。可以使用普通的 1 \times TAE 琼脂糖凝胶电泳，凝胶浓度 1-1.5 %，可以使用高电压，短时间电泳，如 7V/cm 电泳，20 分钟。建议使用 D2000 DNA ladder（Cat: RTM415）作为 Marker。细菌 26S rRNA 迁移率与 800bp 类似，13S rRNA 迁移率与 700bp 类似。

吸光值检测：可以用 A₂₃₀，A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 的数值表示 RNA 的纯度。纯净的 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值应该为 2，我们得到的 RNA 样品比值应在 1.8-2.2 之间，如果比值低于 1.8，表明 RNA 样品中蛋白污染比较严重。A₂₆₀/A₂₃₀ 比值应该在 2-2.2 之间。如果此比值低于 2，表明 RNA 样品中有胍盐的污染。

● 实验示例:



细菌 DH5 α RNA

1, 3 使用 DNA 清除柱后得到的 RNA

1g, 2g DNA 清除柱洗脱后残余的 RNA 和 DNA

1% 琼脂糖凝胶 1 \times TAE 150V 20min

M D2000 DNA ladder

2 ml 过夜菌，50 μ l 洗脱，上样 5 μ l

● 问题指南:

1. 离心柱发生堵塞

离心柱发生堵塞之后会造成 RNA 得率降低甚至不能纯化得到 RNA。

常见原因分析如下：

1.1 细菌破碎不彻底。

细菌破碎不彻底会使吸附柱发生堵塞，同时会影响 RNA 得率及质量。我们建议在进行细菌破壁时，尽量破碎细菌的细胞壁、细胞膜等组织。

1.2 样本初始量过多。

样本使用量过多会导致裂解液 RL plus 裂解细胞时不完全，导致离心柱堵塞。该试剂盒处理样本的初始最大量 10^8 - 10^9 细菌细胞。

1.3 离心机的温度过低。

整个 RNA 分离纯化所有的步骤均在常温（20-25℃）进行。有些低温离心机的温度低于 20℃，可能会造成离心柱的堵塞。如果发生这种现象，请将离心机温度设置到 20-25℃。

2. 提取不到 RNA 或者 RNA 产量低

通常会有多种因素影响回收效率，比如：样本 RNA 含量、操作方法、洗脱体积等。

常见原因分析：

2.1 样本保存不当或样本保存时间过久导致 RNA 已经降解。

建议：新采集的样本应立即放入液氮中速冻，长期保存于-70℃并避免样本的反复冻融；或者将样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNAwait 溶液中。

2.2 样本破碎裂解不充分导致纯化柱堵塞。

建议：溶菌酶破壁时，确保破壁完全。革兰氏阳性菌注意破壁温度和时间。

2.3 洗脱液添加不正确。

建议：确认 RNase-Free 水滴加到了纯化柱膜 O 型垫圈中央位置。

2.4 漂洗液 RW 中没有添加正确体积的无水乙醇。

建议：请按照说明书，在试剂盒使用前，漂洗液 RW 中添加正确体积的无水乙醇并混匀。

2.5 组织样本用量不合适。

建议：每 500 μ l 裂解液 RL 使用最大细菌量 10^9 ，使用过多会导致 RNA 提取量降低并且得到的 RNA 纯度也会降低。我们强烈建议每单次 RNA 提取操作，样本初始用量一定不要超过最大建议量。

2.6 洗脱体积不合适或洗脱不彻底。

建议：纯化柱的洗脱液体积为 50-100 μ l；若洗脱效果并不理想，建议在加入 65℃ 预热的 RNase-Free 水后，延长常温放置的时间，例如放置 5-10 min。

2.7 纯化柱在第二次 RW 洗涤之后有乙醇残留。

建议：漂洗液 RW 洗涤后，吸附柱空甩离心 2 min 是关键步骤，以充分除去吸附柱上残留的乙醇。

3. 纯化获得的 RNA 有降解

纯化得到的 RNA 的质量和样本的保存、RNase 污染、操作等因素有关。

常见原因分析：

3.1 组织样本采集后没有及时保存。

建议：组织样本在收集后若不及时使用，请立即低温保存于液氮中或经液氮速冻后立即转移至-70℃长期保存，或者将样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNAwait 溶液中。提取 RNA 请尽量使用新近采取的组织样本。

3.2 组织样本反复冻融。

建议：组织样本保存时，最好分装成小份，使用时取出其中一份即可，避免样本的反复冻融导致 RNA 的降解。

3.3 操作间有 RNase 引入或没有佩戴一次性手套、口罩等。

建议：RNA 提取实验最好在单独的 RNA 操作间进行，并在实验前清理好实验桌，实验时佩戴一次性手套、口罩，最大程度上避免 RNase 引入导致的 RNA 降解。

3.4 试剂在使用过程中被 RNase 污染。

建议：更换新的植物总 RNA 提取系列试剂盒进行相关实验。

3.5 RNA 操作时所用的离心管、枪头等有 RNase 污染。

建议：确认 RNA 提取时所用到的离心管、枪头、移液器等都是 RNase-Free。

4. RNA 中含有 DNA 污染

4.1 提取的起始菌体量超过最大建议量

建议：步骤 1-样品处理时使用 10^8 - 10^9 细菌，不要超过最大处理量，否则样品的核酸量会超过 DNA 清除柱 CS 的处理极限，导致洗脱下的 RNA 有基因组 DNA 的污染。

4.2 省略了步骤 3-去除基因组污染步骤。

建议：步骤 3-去除基因组污染步骤必不可少，不能省略。DNA 清除柱 CS 能极大限度的去除上清液中的基因组 DNA，使用裂解液 RL plus 洗脱下的 RNA 基本无基因组 DNA 的污染。

4.3 跳过了使用去蛋白液 RD 的漂洗步骤（见操作步骤第 5 步）。

建议：这一步骤对于除去残留的 DNA 以及杂质蛋白十分重要，一定不能省略，否则将会导致纯化得到的 RNA 中含有 DNA 污染和蛋白污染。

5. 纯化获得的 RNA 影响下游实验

经吸附柱纯化的 RNA，如果盐离子、蛋白质含量过多会影响下游实验，比如：逆转录、Northern Blot 等。

1. 洗脱后的 RNA 有盐离子残留。

建议：确认漂洗液 RW 中添加了正确体积的乙醇，并按操作说明的离心转速进行 2 次 RW 洗涤吸附柱（见操作步骤第 6，7 步）。

2. 洗脱后的 RNA 有乙醇残留。

建议：确认 RW 第二次洗涤后，按操作说明的对吸附柱进行空管离心操作（见操作步骤第 8 步），如果还有乙醇残留，可以将空管离心后吸附柱开盖常温放置 5 min，以最大程度上去除乙醇残留。