



(DP430) 细胞/细菌总RNA

提取试剂盒操作指南

——细菌

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170328

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. 细菌培养液，溶菌酶（RT401，客户自备，提取细菌总RNA时需配备。）
2. 无水乙醇， β -巯基乙醇
3. 一次性无菌注射器（DNase I配置），移液器及配套RNase-Free无菌枪头（200 μ l，1ml）
1.5 ml，2.0ml 离心管（RNase-free）
4. 通风橱 涡旋振荡器 台式低温离心机



实验准备-试剂盒准备1

第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。并在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。



DNase I储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550 μ l RNase-Free ddH₂O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。



注意：从-20 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。

实验准备-试剂盒准备2

此步骤建议在通风橱内操作

操作前在RL中加入 β -巯基乙醇至终浓度为1%，如1 ml RL中加入10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RL 4 $^{\circ}$ C可放置一个月，裂解液RL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。



Step 1



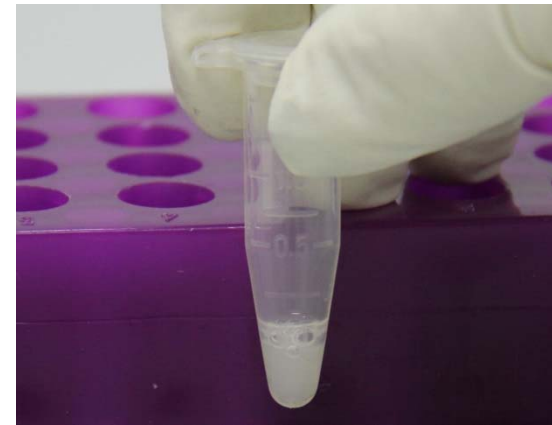
4°C 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心 2 min 收集菌体（收集菌体的最大量不超过 1×10^9 ），仔细去除所有培养基上清，以后的所有离心步骤均在室温（20-25°C）进行。

注：如果培养基上清去除不完全，将对第二步中的细胞壁消化过程产生抑制。

Step 2

用含有溶菌酶的100 μ l TE缓冲液（客户自己配制，配制方法见下表）彻底重悬菌体，孵育时间见下表。

	TE缓冲液中的溶菌酶终浓度	孵育时间（室温）
G-细菌	400 μ g/ ml	3-5 min
G ⁺ 细菌	3 mg/ ml	5-10 min



Step 3



加入350 μ l裂解液RL（在使用前请加入 β -巯基乙醇），涡旋振荡混匀，若出现不溶性沉淀，12000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心2 min，将上清转移至另一离心管中。

Step 4



加入250 μ l无水乙醇，混匀
(此时可能会出现沉淀)



将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中，
12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心30-60 sec，倒
掉废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

Step 5



向吸附柱CR3中加入350 μ l 去蛋白液RW1,
12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心30-60 sec,
弃废液, 将吸附柱放回收集管中。

Step 6

DNase I 工作液的配制：

以一个样品为例：取10 μl DNase I 储存液放入新的RNase-free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀（用移液枪轻柔吹打混匀）。

如同时提取多个样品，建议混合统一配置DNase I 工作液。如样品较多建议在配置时预留出一定的量，以免因移液器的误差或枪头吸附造成总量不够的情况。

Step 7



向吸附柱CR3中央加入80 μ l的DNase I 工作液，室温放置15 min。

Step 8



向吸附柱CR3中加入350 μ l 去蛋白液RW1, 12,000 rpm(\sim 13,400 \times g) 离心30-60 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。

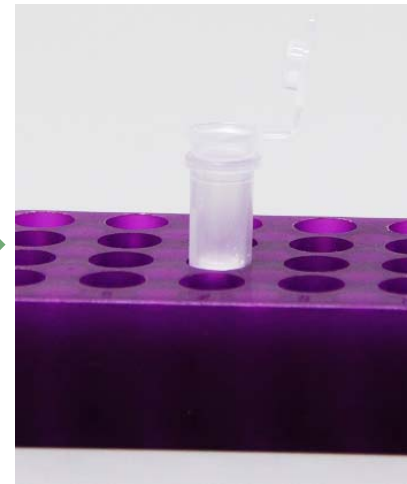
Step 9



向吸附柱CR3中加入500 μ l漂洗液RW
(使用前请先检查是否已加入乙醇)，
室温放置2 min，12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)
离心30-60 sec，倒掉废液，将吸附柱
CR3放回收集管中。

Step 10 重复操作步骤9

Step 11

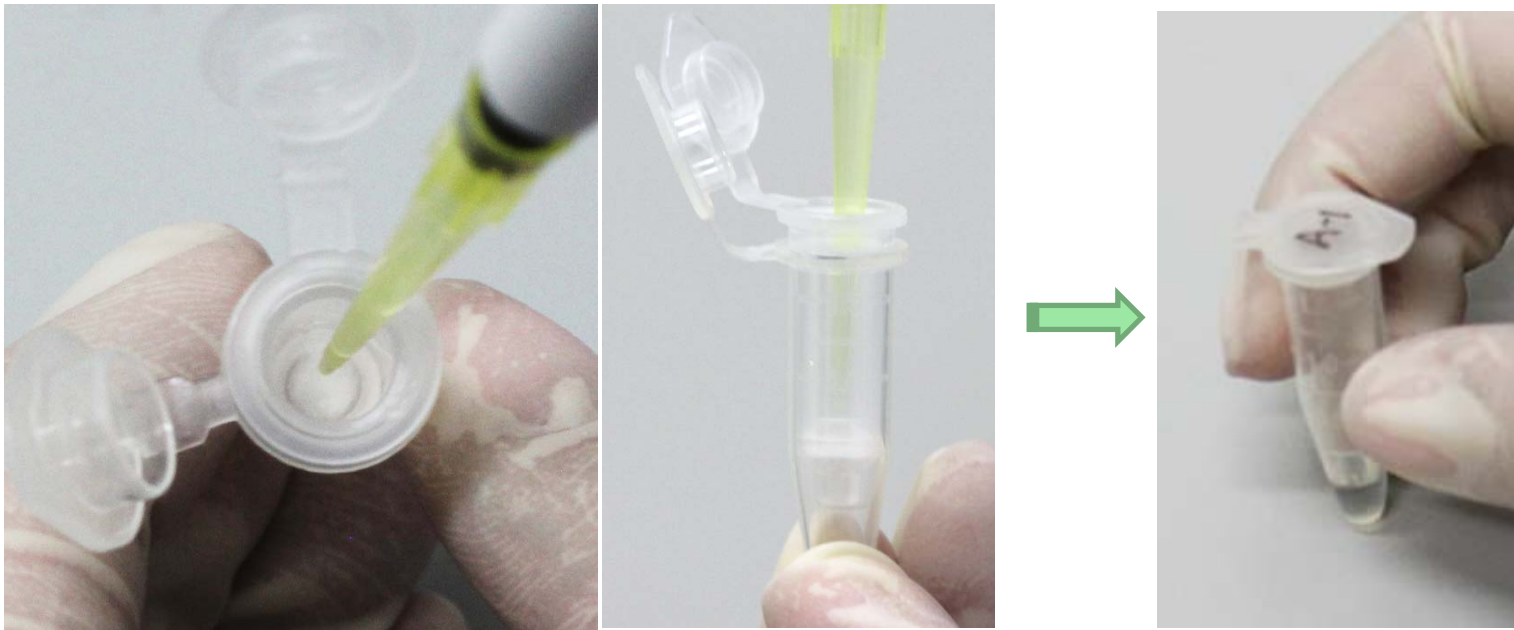


将吸附柱放入新的2 ml收集管中，
12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min，去除残余液体。

离心后将吸附柱CR3在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（RT, qPCR等）实验。
但也不要时间过长以免过分干燥核酸不易溶解或RNA降解。

Step 12



将吸附柱CR3转入试剂盒自带的离心管中，加30–100 μl RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，4°C 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心2 min。

洗脱缓冲液体积不应少于30 μl ，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70°C，以防降解。