

YALEPIC® 细菌 RNA 提取试剂盒 (含 DNase I)

YALEPIC® Bacteria Isolation Kit (DNase I)

产品货号: YR23005

产品保存及运输条件:

DNase I 及 10 × DN Buffer, 低温运输, -20℃ 保存。其它组分常温运输, 10 ~ 30℃ 室温保存。

产品概述

YALEPIC® Bacteria Isolation Kit (DNase I) 基于异硫氰酸胍裂解与硅基质膜纯化相结合的技术, 适用于从细菌中快速提取总 RNA。提取过程中无需使用氯仿, 能提取纯化大分子量的高品质 RNA, 有效去除蛋白质、DNA 及其他杂质, 几乎基因组 DNA 残留, 如敏感实验需完全去除残留 DNA, 可用 RNase-free 的 DNase I 进行消化去除。提取的 RNA 可用于 RT-PCR、荧光定量 PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、Ploy(A)筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

产品组分

序号	产品组分	YR23005 (50 T)
①	YL Buffer	25 ml
②	Wash Buffer A	42 ml
③	Wash Buffer B	12 ml
④	RNase-free ddH ₂ O	11 ml
⑤	DNase I (1U/μl)	1000 U
⑥	10 × DN Buffer	1 ml
⑦	Pure Columns YF with Collection Tubes	50 T
⑧	Pure Columns RT with Collection Tubes	50 T
⑨	Nuclease-free Centrifuge Tubes (1.5 ml) 赠	50 T

适用范围

10⁶ ~ 10⁸, 最多不超过 1 × 10⁹ 个革兰氏阴性菌及革兰氏阳性菌。

自备试剂及仪器

无水乙醇 (提取 RNA 专用) ; 70% 乙醇 (RNase-free ddH₂O 配制) ; Nuclease-free 离心管; Nuclease-free 移液器吸头; 高速离心机; 恒温水浴锅; 涡旋振荡仪等。

实验准备及注意事项

1. 使用本试剂盒前做好防护措施, 穿戴实验服、手套、口罩等, 与常规 RNA 实验操作环境一致。
2. 使用 Nuclease-free 的移液器吸头和消耗品, 配制溶液应使用 RNase-free ddH₂O, 试剂使用完后立即盖好瓶盖, 避免交叉污染的风险。
3. 使用前请检查 **YL Buffer** 中是否有晶体析出, 如有晶体析出, 可放置 56°C 水浴锅使晶体溶解, 混匀后放置室温使用。
4. 首次使用前, 向 **Wash Buffer B** 中加入瓶标签指定体积的无水乙醇。
5. 使用新鲜样本, 若不能及时提取, 将样本立即置于液氮中, 速冻后于 -85 ~ -65°C 保存, 并避免反复冻融。
6. 样本破碎需彻底, 否则会影响 RNA 的产量; 匀浆时尽量控制温度, 防止因高温导致的 RNA 降解。
7. 需配制**溶菌酶缓冲液**。(注: Lysozyme 干粉需在缓冲液中进行配制, 否则会导致酶失活, 具体工作缓冲液配制方法为: 20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM Na₂-EDTA, pH 8.0; 1.2% Triton X-100。121°C 灭菌处理 20 min, 加入适量的 Lysozyme。详细配方见 (YALI #YX27006))

实验流程

1. 4°C 12,000 rpm 离心 2 min 收集菌体 (菌体量 $\leq 1 \times 10^9$), 小心弃去所有上清。(注: 上清残留会影响后续的消化过程)
2. 用 100 μ l 含 lysozyme 的溶菌酶缓冲液彻底重悬菌体, 室温孵育。具体配方和孵育时间如下: 革兰氏阴性菌使用 400 μ g/ml 终浓度的 Lysozyme 孵育 3 ~ 5 min; 革兰氏阳性菌使用 20 mg/ml 终浓度的 Lysozyme 孵育 5 ~ 10 min。
3. 加入 350 μ l **YL Buffer**, 涡旋振荡使其充分裂解。(注: 此步骤可能出现不溶性沉淀)
4. 将溶液与沉淀全部加入到过滤柱 (**Pure Columns YF with Collection Tubes**) 中, 12,000 rpm 离心 2 min。
5. 向上步得到的滤液中加入 250 μ l 无水乙醇 (自备), 混匀 (此时可能会出现沉淀)。将所得溶液和沉淀全部加入到吸附柱 (**Pure Columns RT with Collection Tubes**) 中, 若一次不能将全部溶液加入吸附柱中, 可分两次转入。4°C 12,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。(注: 吸附柱不超过 100 μ g 载量, 否则会影响 RNA 的产量和纯度)
6. 向吸附柱中加入 700 μ l **Wash Buffer A**, 4°C 12,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中废液, 将吸附柱放回收集管中。(如下游实验对微量 DNA 敏感, 则建议用以下步骤替代步骤 6, 彻底去除微量 DNA)

- *1) 向吸附柱中加入 350 μl **Wash Buffer A**, 4°C 12,000 rpm 离心 15 s, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
 - *2) 配制 DNase I 混合液: 取 52 μl **RNase-free ddH₂O**, 向其中加入 20 μl **DNase I** (1 U/ μl) 及 8 μl **10 × DN Buffer**, 混匀配制成终体积为 80 μl 的反应液。
 - *3) 向吸附柱中加入 80 μl 配制好的 DNase I 反应液, 20 ~ 30°C 孵育 15 min。
 - *4) 向吸附柱中加入 350 μl **Wash Buffer A**, 4°C 12,000 rpm 离心 15 s, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
7. 向吸附柱中加入 500 μl **Wash Buffer B** (使用前检查是否加入无水乙醇), 4°C 12,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中废液, 将吸附柱放回收集管中。重复该步骤一次。
8. 4°C 12,000 rpm 离心 2 min, 弃去收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。
(注: 乙醇残留会影响后续的酶促反应, 应将吸附柱中残余的乙醇彻底去除)
9. 将吸附柱置于一个新的 **Nuclease-free Centrifuge Tubes (1.5 ml)** 中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 30 ~ 50 μl **RNase-free ddH₂O**, 室温放置 2 ~ 5 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集 RNA 溶液, 提取的 RNA 可直接用于下游实验或于 -85 ~ -65°C 保存, 防止降解。

注:

- 1) RNase-free ddH₂O 体积不应小于 30 μl , 体积过小影响回收率。
- 2) 如需提高 RNA 产量, 可用新的 30 ~ 50 μl RNase-Free ddH₂O 滴加至膜中重复步骤 9。
- 3) 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 9。