版本号:260218

EASYspin Plus Bacteria/Tissue/Cell RNA Kit

EASYspin Plus 细菌/组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒

目录号：RN43

❖ 适用范围：

适用于快速提取细菌/组织/细胞RNA，使用独有基因组DNA清除柱技术确保有效清除gDNA残留，RNA可直接用于反转录PCR，荧光定量PCR.。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(RN4301)
TE Buffer（PH8.0）	室温	10 ml
溶菌酶	4°C	30 mg
裂解液 RLT Plus	室温	25 ml
去蛋白液 RW1	室温	35 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇
RNase-free H_2O	室温	5 ml
DNA 清除/RNA 吸附通用柱和收集管	室温	100 套

本试剂盒除低温组分外在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项：

1. 常温运输，除低温保存的组分外的试剂盒，室温保存。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

产品说明书更新提醒：

1. 基因组 DNA 清除柱和 RNA 吸附柱是完全相同的离心柱。旧版说明书命名按照提取过程中的作用区分命名，新版为了使用方便不混淆，按照本质是同一个东西命名为：DNA 清除/RNA 吸附通用柱，两包离心柱是同一个东西不用再区分了。

2. 旧版操作步骤中加入等体积 70%乙醇，改成加入 0.5 倍体积无水乙醇。因此试剂盒不再需要 70%乙醇瓶子这个组分了。

❖ 产品介绍：

本公司独家推出 EASYspin 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，进一步独家研发出 DNA 清除/RNA 吸附通用柱技术配合新型溶液体系，一般不需要 DNase 消化，也无需使用酚/氯仿、β-巯基乙醇等有毒有害试剂。适用于从多种细菌/组织/细胞中高效提取高纯度、高质量的 RNA。得到的 RNA 纯度高，gDNA 残留少，无蛋白和其他杂质污染，可直接用于 RT-PCR、RT-qPCR、RNA 高通量测序建库、芯片分析等多种下游实验。

❖ 产品特点：

1. 无需有毒的苯酚/氯仿、β-巯基乙醇等试剂，也无需进行乙醇沉淀等步骤。
2. DNA 清除/RNA 吸附通用柱可以 1 min 过滤清除 gDNA，不需要繁琐的 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR、高通量测序建库等实验。最快全程仅需 10 min。最大限度的简化了操作和减少了 RNA 降解几率。
3. RNA 完整性极好不降解 ，电泳图 28S:18S 典型比值大于 2:1 。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 2.1-2.2（100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右，很多公司的产品因为残留蛋白或 DNA 较多，造成比值降低，无法达到 2.2 这个纯度标准，因此降低要求 1.9-2.0 就凑合使用了，但是艾德莱的产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准）。
5. 适用于几乎全部的菌种，包括其它公司失败的复杂困难菌种例如金葡菌、链霉菌、苏云金芽孢杆菌、结核分枝杆菌等等（可咨询艾德莱技术）。

❖ 注意事项

1. 所有的离心步骤均在室温完成。使用转速可以达到13, 000 rpm的传统台式离心机。
2. 裂解液RLT Plus和去蛋白液RW1中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**

3. 本试剂盒可去除体系中绝大部分的DNA残留，纯化获得的RNA通常无需使用DNase I处理即可用于下游实验操作。不同样本核酸含量相差大，如果下游实验对痕量DNA十分敏感，可以使用DNase I（货号：RN45）进一步清除DNA污染。或者提取过程中进行DNase柱上消化（货号：RN34 DNase I 柱上消化试剂盒）。
4. 样品处理量不要超过DNA清除/RNA吸附通用柱的处理能力，否则易造成DNA残留或者产量降低。不同物种种类RNA/DNA相差极大，所以开始摸索实验条件时，如果不清楚样品DNA/RNA含量时宁可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
5. **注意：**本试剂盒也可以提取组织细胞RNA，具体步骤可以参考本公司产品RN28-EASYspin Plus组织细胞RNA快速提取试剂盒说明书进行。可以主页上搜索下载说明书，或者联系我们索取。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

⇨ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶按照标签说明加入无水乙醇!

⇨ 提取细菌 RNA 需先配制加了溶菌酶或者 lysostaphin 的 TE Buffer，TE Buffer 中需加入溶菌酶或者 lysostaphin（终浓度 1 mg/ ml）。

1. 离心收集 1−2ml 菌液(10^8-10^9 细胞)到一个 1.5 ml 离心管，尽可能去除上清，注意残留的上清不能超过 20 μl/每使用 100 μl TE(见下面步骤 2)。
2. 根据细胞的种类和数量，充分重悬细胞在 100 μl(5×10^8 细胞)/ 200 μl(5×10^8-7.5x10^8 细胞) TE Buffer 中（TE 中已加入溶菌酶至终浓度 1 mg/ ml）或者直接用 TE 重悬后，用干净枪头挑取少许溶菌酶加入。

   ▲ 如果是金黄色葡萄球菌需要加入 lysostaphin 到终浓度 1 mg/ml。
3. 室温(15−25°C)温育 5 min（加溶菌酶的），或者 37°C 温育 15 min（加 lysostaphin 的），破解细胞壁。每 2 min 涡旋振荡 10 sec 帮助破壁。

   ▲ 注意各种细菌破壁的难易程度不一样，一般革兰氏阴性菌如 E.coli 使用上面的条件就足够了，甚至可能省略该步骤，但是某些革兰氏阳性菌如 B. subtilis 难破壁需要提高溶菌酶浓度到 15 mg/ml 和温育时间到 15 min。如果是金黄色葡萄球菌需要加入 lysostaphin 到 1 mg/ml，37°C 温育 15 分钟。总之不同细菌类型破壁难易程度不同，有的难破壁的种类需要根据用户自己的具体情况调节酶的种类、工作浓度和温育温度、时间，此外还可以联合使用玻璃珠击打，机械破壁，蛋白酶 K 消化等方法帮助破壁。
4. 短暂离心 1 min 收集细胞到管底，吸弃上清。涡旋振荡重悬分散细胞。

5. 加入 500 μl 裂解液 RLT Plus，吹打混匀后剧烈振荡 20 sec，充分裂解。

▲ 一般加入裂解液后充分涡旋吹打后应该见不到明显团块或者不溶物，极少数情况下如果有明显团块或者不溶物可以将裂解物 13, 000 rpm 离心 3 min，沉淀不能裂解的碎片或者不溶物，将裂解物上清全部转到新离心管再进行下一步。

6. 将处理好的匀浆液加到 DNA 清除/RNA 吸附通用柱上(柱子放在 2 ml 收集管内)，13, 000 rpm 离心 1 min，丢弃通用柱，**保留收集管中的滤液（RNA 在滤液中）**。

7. 向滤液中加入 0.5 倍滤液体积的无水乙醇（约 250 μl），移液器吹打混匀。

▲若加乙醇后出现浑浊或有絮状物产生，属正常现象，立即吹打混匀，不要离心。

▲如果用户习惯按照旧版本说明书加等体积 70%乙醇，可以自配 70%乙醇按照等体积加 500 μl。

▲70%乙醇配制方法：按照 9 ml RNase free H_2O+21 ml 无水乙醇加到一个新的塑料瓶子里面混匀即可），如果少量使用，可以按照上述比例少量配制。

8. 立即将上述混合液加入至一个新的 DNA 清除/RNA 吸附通用柱内（已放入收集管中），静置 1 min，13, 000 rpm 离心 30 sec，**弃滤液**，将通用柱放回收集管。

9. 向通用柱中加入 700 μl 去蛋白液 RW1，室温放置 30 sec，13, 000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。

10. 向通用柱中加入 500 μl 漂洗液 RW（**使用前请检查是否已加入无水乙醇**），13, 000 rpm 离心 15 sec，弃滤液。

11. 重复步骤 10 漂洗一遍。

12. 将通用柱放回空收集管中，13, 000 rpm 空甩离心 2 min。尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

13. 将通用柱转移至新的 1.5 ml 离心管中，向通用柱膜中央悬空滴加 30−50 μl 的 RNase-free H_2O，静置 1 min，13, 000 rpm 离心 1 min。

▲洗脱体积建议不少于 30 μl，体积过小会影响核酸回收效率。

▲以下步骤都可以帮助提高 RNA 产物浓度：

RNase-free H_2O 于洗脱前先在 70-90°C 预热；

将第一次洗脱液重新加入通用柱进行第二次洗脱。

14. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或−85°C−65°C 保存。