

## 产品概述

Bacteria RNA Plus Kit为针对原核生物（包括革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌）RNA提取优化的试剂盒。本试剂盒包括含有优化缓冲体系、螯合剂及温和蛋白变性剂等成分的Bacteria RNA Plus Reagent，以及能高效抑制内源性RNA酶，同时促进蛋白变性的RNA isolater Total RNA Extraction Reagent。两者配合使用，可大幅提高原核生物RNA提取产量，同时保证良好的产物质量。提取细菌RNA时，仅在常规操作前加一步高温预处理，无需机械破碎或酶解步骤，即可得到高质量及产量的细菌总RNA。本试剂盒也适用于酵母等真菌总RNA的提取。

## 产品组分

组分	R403-01 (100 rxn)
Bacteria RNA Plus Reagent	20 ml
RNA isolater Total RNA Extraction Reagent	100 ml

## 储存条件

RNA isolater Total RNA Extraction Reagent 4℃避光保存；

Bacteria RNA Plus Reagent室温存放，如果试剂在存放过程中产生沉淀析出，请于65℃加热片刻溶解并混匀。

## 产品优势

Bacteria RNA Plus Kit可达到以下卓越效果：

1. 大幅提高革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌总RNA提取量；
2. 保证良好的RNA产物质量，更易满足后续实验需求；
3. 操作简便，省时，无需溶菌酶或超声、研磨等破壁处理，排除操作可能引入的RNA降解；
4. 无细菌基因组DNA污染。

## 自备材料

恒温水浴锅/金属浴、冷冻离心机、涡旋振荡器（漩涡混合器）、氯仿、异丙醇、75%乙醇（DEPC水配制）、RNase-free 水/DEPC水；RNase-free枪头和RNase-free 1.5 ml离心管

## 操作步骤

### 步骤一：Bacteria RNA Plus Reagent前处理

1. 在合适的培养液中接种目的原核细胞。
2. 在合适的温度环境下摇菌至细胞生长至对数期，摇过对数生长期的细胞将不适于RNA提取，需要重新接种。
3. 预热水浴锅至95℃，预冷冷冻离心机至4℃。
4. 转移1~1.5 ml菌液（细胞个数可达10<sup>8</sup>数量级）至预冷的离心管。
5. 4℃10000 g离心3 min沉降细胞。
6. 在此期间将实验需要量的Bacteria RNA Plus Reagent试剂放入95℃水浴锅预热，请勿整瓶反复加热，易使产品性质趋于不稳定。
7. 离心完毕后，去掉上清，用200 μl预热的Bacteria RNA Plus Reagent试剂吹打重悬细胞，如果细胞量不足5×10<sup>7</sup>，可使用100 μl Bacteria RNA Plus Reagent试剂处理。
8. 快速重悬完毕后，95℃水浴4 min，细胞管数较多时，请尽量严格控制处理时间，过短的处理时间（如小于3 min）可能导致细胞破裂不充分，但处理不要超过5 min。
9. 处理后的细胞悬液中加入1 ml RNA isolater Total RNA Extraction Reagent试剂，用移液器吹打混匀，冰上放置5 min。

## 步骤二：总RNA提取

- 1.向以上裂解液中加入预冷的1/5体积的氯仿。盖紧离心管盖，用手摇匀，涡旋振荡15 sec，成乳浊液，冰上或4℃静置5 min。
- 2.12000 g，4℃离心15 min。注意此步必须低温离心，否则产物会有少量基因组污染。
- 3.小心取出离心管。此时溶液分为三层：无色的上层、白色中间层以及红色的下层。小心吸取上层水相至一个新的离心管中。  
\*上层体积约占总体积的60%。建议吸取600 μl，不要吸的太完全，以防吸到中间层导致基因组污染。
- 4.加入等体积预冷的异丙醇，上下颠倒混匀。-20℃静置10 min。
- 5.12000 g 4℃离心10 min。通常可以看见白色沉淀。
- 6.小心弃去上清，加入1ml预冷的DEPC水配制的75%乙醇。充分洗涤管盖和管壁，并轻弹管底，让沉淀悬浮起来，4℃或冰上静置3-5 min。
- 7.12000 g，4℃离心5 min，弃去上清。  
\*为减少杂质残留，应尽可能的将上清弃干净。建议弃去大部分上清后，短暂离心将所有液体甩至管底，再用移液器将剩余液体吸掉。
- 8.在洁净的环境中室温敞口干燥沉淀2-5 min。注意不可过分干燥，否则会导致RNA难以溶解。
- 9.加入适量的RNase-free 水（DEPC水）溶解沉淀，轻轻吹打至沉淀完全溶解。待完全溶解后，取少量检测，其余在-80℃保存。

## 步骤三：产物检测

### A.完整性检测

- 1.取1 μl RNA至8 μl TE中，加入1 μl 10 × DNA loading buffer，混匀。
- 2.进行1%琼脂糖凝胶电泳。原核生物可看到清晰的23S/16S核糖体RNA两条带，5S条带微弱，证明RNA完整性较好。

### B.纯度及浓度检测

- 1.用TE稀释RNA，使用分光光度计检测230nm、260nm、280nm OD值，并计算OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>和OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>。纯的RNA的OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值应在1.8-2.2之间。若OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>小于1.8，可能有DNA或蛋白残留；若OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>小于1.6，可能RNA干燥过度。OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>比值应在2左右，过低则提示有有机溶剂残留，75%乙醇洗涤不够充分。
2. RNA浓度 (ng/μl) = OD<sub>260</sub> × 稀释倍数 × 40。

## 预期产量

以革兰氏阴性菌大肠杆菌为例，使用Bacteria RNA Plus Kit，1.5 ml对数期细胞（OD<sub>600</sub>=1.0，1.5×10<sup>8</sup>细胞个数）产量大于30 μg，对于革兰氏阳性菌枯草杆菌，相同细胞数量的RNA产量大于20 μg。使用提取的RNA产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，显示清晰分明的16S和23S核糖体RNA条带，23S条带略深一些，5S核糖体RNA条带极弱。

## 常见问题与解决方案

### Q. RNA产量偏低。

A. 使用Bacteria RNA Plus Kit提取原核生物RNA达不到预期产量，可能原因有：a. 裂解不够完全或起始菌量低于要求起始量，可适当增加起始菌量，或延长处理时间到5 min；b. RNA沉淀未完全溶解，可在60℃加热5 min充分溶解RNA。

### Q. RNA降解。

A. 使用Bacteria RNA Plus Kit高温处理细菌数分钟不会引起RNA降解，加入RNA isolater后可与游离出来的RNA充分接触，保护RNA不受降解。分离出水相后的处理过程如果存在RNase则可能引起降解，因此请务必在实验整体过程中使用RNase-free的枪头及离心管，使用DEPC处理过的水配制试剂及溶解RNA，保证操作区域的清洁，减少RNA降解的可能。某些原核细菌如枯草杆菌内源性RNase含量较高，难以完全灭活，如果发现产物有部分降解，可适量降低起始菌量，使用200 μl处理液，严格按照标准操作流程进行实验，全程保持低温操作，并以熟练的操作手法尽量缩短不必要的操作时长。