

ISOGEN、ISOGEN-LS

RNA 提取试剂

使用 ISOGEN 从革兰氏阳性菌提取 RNA

总体来说，革兰氏阳性菌的细胞壁较厚，普通的操作流程回收到的 RNA 的量比革兰氏阴性菌少。因此，使用玻璃珠破坏革兰氏阳性菌的细胞壁后，用 ISOGEN 提取 RNA。

操作流程

革兰氏阳性菌(3ml 培养)

↓ 离心(10k×g、4°C、10 分钟)(1.5ml×2tube)

沉淀^{*1}

↓ ←ISOGEN 300μl

↓ ←玻璃珠 0.1g

↓ Vortex(2~3 分钟、室温)^{*2}

↓ ←ISOGEN 700μl^{*3}

↓ 孵化(55°C、30 分钟)

↓ 离心(10k×g、4°C、10 分钟)^{*4}

上清

↓ ←氯仿 200μl

↓ 激烈混合(15 秒)

↓ 静置(3 分钟、室温)

↓ 离心(12k×g、4°C、15 分钟)

水相(500~600μl)^{*5}

↓ ←异丙醇 500μl

↓ 静置(5~10 分钟、室温)

↓ 离心(12k×g、4°C、15 分钟)

沉淀

↓ ←70% EtOH 1ml

↓ 离心(7.5k×g、4°C、5 分钟)

沉淀

↓ ←干燥后溶解于 100μl 的 TE

Total RNA 溶液

*1 尽可能去除培养基

*2 RNA 的回收率不理想时，可使用 Vortex 进一步破坏细胞壁

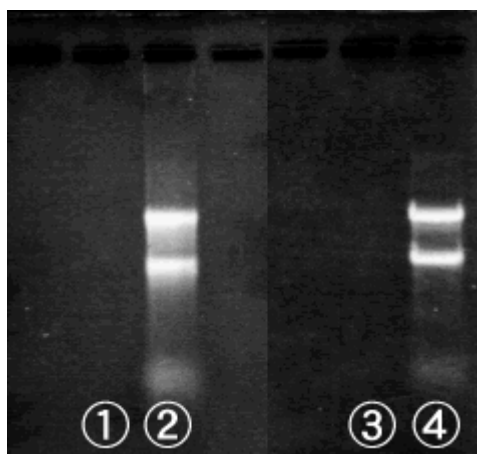
*3 此时的比例为 Sample : ISOGEN = 1 : 20。

*4 离心后，去除细胞壁、不溶性细胞碎片、玻璃珠、没有溶菌的细胞，将上清匀浆液移至新管。若混入不溶物，继续进行离心分离。若液体量较少，补充加入 ISOGEN，使其充分混合。

*5 水相大约是 ISOGEN 量的 60%。

结果

普通的 ISOGEN 法只能提取少量的 RNA，但使用了玻璃珠进行上述的实验，纯度与回收量也大幅改善。



菌名	提取法	OD260/280	RNA 回收量(μg)	图片
<i>Nocardia otitidis caviarum</i>	仅经过普通的 ISOGEN 处理	0.827	0.71	Lane ①
<i>Nocardia otitidis caviarum</i>	玻璃珠+ISOGEN 处理	1.618	4.70	Lane ②
<i>Staphylococcus aureus</i> PS96	仅经过普通的 ISOGEN 处理	0.866	0.74	Lane ③
<i>Staphylococcus aureus</i> PS96	玻璃珠+ISOGEN 处理	1.798	4.30	Lane ④

