

Takara MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (Code 9767)

-세균 (Bacteria)의 RNA 추출 방법-

1) Gram(-) Bacteria의 RNA 추출 ($1.0 \sim 5.0 \times 10^9$ Gram(-) Bacteria cells)

- (1) Bacteria를 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리 후, 상층액을 완전히 제거한다.
- (2) 상층액을 제거한 튜브에 600 μl Buffer RL을 첨가하여 lysis한다 (침전물 또는 덩어리가 보이지 않도록 완전히 lysis한다.).
- (3) 제품 매뉴얼 7페이지 VII. Protocols. For cultured mammalian cells의 2번부터 매뉴얼에 따라 실험을 진행한다.

(Optional) 위의 방법으로 RNA정제 효율이 낮은 경우.

* gDNA Eraser Spin column은 DNA 제거 이외에 cell debris 제거의 역할을 겸한다. 이 프로토콜은 lysozyme의 처리로 cell debris가 상당수 제거되었기 때문에 gDNA Eraser Spin Column step을 생략하고 더 높은 수율의 RNA를 추출할 수 있다.

- (1) Lysozyme (별도구매)을 TE buffer에 희석해 최종농도 0.5 mg/ml의 lysozyme solution을 준비한다.
- (2) Bacteria를 원심분리 하여 상층액을 완전히 제거한다.
- (3) PBS Buffer를 첨가하고 bacteria를 resuspension 시켜 wash 후 원심분리 하여 상층액을 제거한다.
- (4) 100 μl 의 lysozyme solution (0.5 mg/ml)을 넣고 37°C에서 5-10 분 incubation 한다.
- (5) 350 μl 의 Buffer RL과 450 μl 의 70% ethanol을 첨가한다.
- (6) Mixture를 RNA Spin Column에서 12,000 rpm에서 1 분간 원심분리 후 통과된 액체를 제거한다.
- (7) 제품 매뉴얼 7페이지 VII. Protocols. For cultured mammalian cells의 9번부터 매뉴얼에 따라 실험을 진행한다.

2) Gram(+) Bacteria의 RNA 추출 ($0.5 \sim 2.0 \times 10^9$ Gram(+) Bacteria cells)

- (1) Bacteria를 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리 후, 상층액을 완전히 제거한다.
- (2) 500 μl PBS Buffer를 첨가하여 bacteria를 resuspension시킨다.
- (3) 50 μl 의 Lysozyme (20 mg/ml, 별도구매)을 첨가하고, pipet으로 완전히 섞는다.
- (4) 37°C에서 60분간 incubation한다. (20분마다 튜브를 뒤집어 섞는다.)

(5) 600 μl Buffer RL을 첨가한다 (침전물 또는 덩어리가 보이지 않도록 완전히 lysis한다.).

(6) 제품 매뉴얼 7페이지 VII. Protocols. For cultured mammalian cells의 2번부터 매뉴얼에 따라 실험을 진행한다.

3) 액체질소를 이용한 bacteria RNA 추출 ($1.0 \sim 5.0 \times 10^9$ Gram(-) / $0.5 \sim 2.0 \times 10^9$ Gram(+) Bacteria)

(1) 액체질소를 사용하여 bacteria를 얼린 후 막자 사발을 이용해 곱게 간다.

(2) (1)에서 준비한 bacteria를 1.5 ml tube에 옮긴다.

(3) 600 μl Buffer RL을 첨가한다 (침전물 또는 덩어리가 보이지 않도록 완전히 lysis한다.).

(4) 제품 매뉴얼 8페이지 VII. Protocols. For mammalian tissues의 2번부터 매뉴얼에 따라 실험을 진행한다.