

Version: AC 6.1 (2024.08.20修订)

SPARKeasy Bacteria RNA kit

细菌RNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC0401

01/产品组分

序号	组分	50 次 AC0401
1	TE (pH 8.0)	10 mL
2	溶菌酶	20 mg
3	裂解液 RLT	50 mL
4	去蛋白液 RW1	40 mL
5	漂洗液 RW	10 mL 第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇
6	RNase Free H ₂ O	10 mL
7	RNase Free 吸附柱 RA 和收集管	50 套
8	RNase-Free 收集管(1.5 mL)	50 个

02/保存条件

溶菌酶于-20℃保存，其他组分室温（15-25℃）保存。

03/产品概述

该产品基于独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后用乙醇调节结合条件后，总 RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的去蛋白、漂洗的步骤将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase Free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。该产品可在 30 min 内完成样品 RNA 的提取，提取的总 RNA 完整性好，无蛋白和基因组 DNA 污染。

04/自备材料

无水乙醇、Lysostaphin（破壁困难的革兰氏阳性菌需要）

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

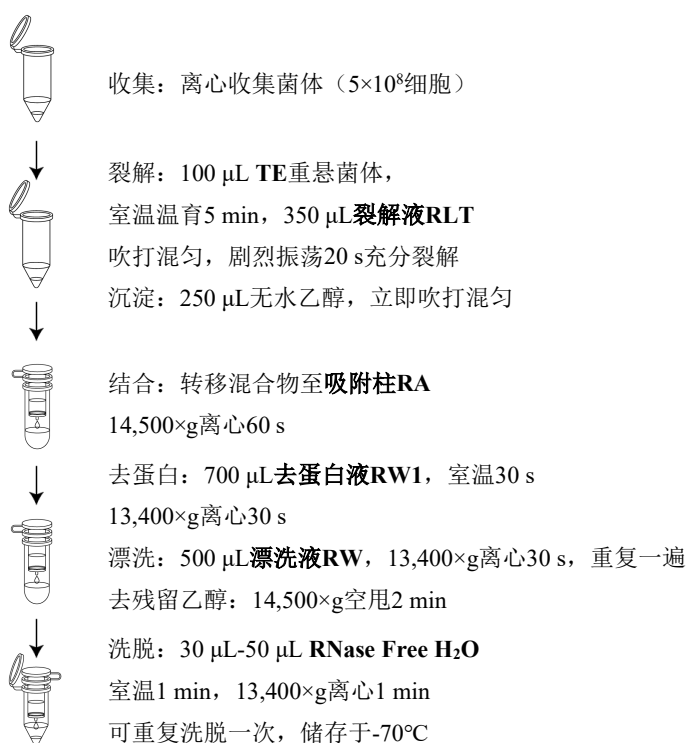
- ◇ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量无水乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- ◇ 裂解液 RLT 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- ◇ 所有离心操作步骤，均可在室温（15-25℃）下进行。
- ◇ 提取细菌 RNA 需先配制加了溶菌酶的 TE（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH8.0），TE 中溶菌酶的终浓度为 1 mg/mL。

06/使用方案

1. 离心收集 1-2 mL 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 μ L。
2. 根据细胞的种类和数量，充分重悬细胞在 100 μ L（ 5×10^8 细胞）/200 μ L（ 5×10^8 - 7.5×10^8 细胞）TE（已加入溶菌酶）中，或者直接 TE 重悬后，用干净枪头挑取少许溶菌酶加入。
3. 室温（15-25℃）温育 5 min，破解细胞壁。每 2 min 涡旋振荡 10 s 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 *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 10 min。如果金黄色葡萄球菌需要加入 Lysostaphin 到 1 mg/mL，37℃温育 15 min。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. 加入 350 μ L（100 μ L TE 重悬）或者 700 μ L（200 μ L TE 重悬）裂解液 RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 s，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 12,500 rpm（14,500 $\times$ g）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一个新离心管再进行下一步。
5. 加入 250 μ L 无水乙醇（100 μ L TE 重悬）或者 500 μ L 无水乙醇（200 μ L TE 重悬），立即吹打混匀。
6. 立刻将混合物（每次小于 700 μ L，多可以分两次加入）加入一个吸附柱 RA 中（吸附柱放入收集管中），12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心 60 s，弃掉废液。
7. 加 700 μ L 去蛋白液 RW1，室温放置 30 s，12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心 30 s，弃掉废液。
▲如果 DNA 残留明显，可在加入 RW1 后室温放置 5 min 再离心。
8. 加入 500 μ L 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心 30 s，弃掉废液。加入 500 μ L 漂洗液 RW，重复一遍。
9. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm（14,500 $\times$ g）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。

10. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase Free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μL RNase Free H_2O （事先在 70-90°C 水浴中加热可提高产量），室温放置 1 min，12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心 1 min。
11. 如果预期 RNA 产量 > 30 μg ，加 30-50 μL RNase Free H_2O 重复步骤 10，合并两次洗脱液，或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍（如果需要 RNA 浓度高）。
- ▲ 使用第一次洗脱液重复洗脱两遍的 RNA 浓度高，分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%，但是浓度要低，用户根据需要选择。

07/流程简图



08/相关产品

AA0201 SPARKeasy 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒

AA0202 SPARKeasy 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒（含蛋白酶 K）

AA1906 蛋白酶 K（10 mg/mL）

AC0402 SPARKeasy 改良型细菌 RNA 快速提取试剂盒

AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit（With gDNA Eraser）

AG0305 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR（With gDNA Eraser）

AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix（With ROX）

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

