Version：AC 6.1（2024.08.20修订）

SPARKeasy Improved Bacteria RNA kit

改良型细菌RNA快速提取试剂盒

（离心柱型）

目录号：AC0402

01/产品组分

序号	组分	50 次 AC0402
1	TE（pH 8.0）	10 mL
2	溶菌酶	20 mg
3	裂解液 RLT Plus	25 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	70%乙醇	9 mL RNase Free H_2O 第一次使用前加入 21 mL 无水乙醇
7	RNase Free H_2O	10 mL
8	基因组 DNA 清除柱 和收集管	50 套
9	RNase Free 吸附柱 RA 和收集管	50 套
10	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 SPARKeasy 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术，以及基因组 DNA 清除柱技术（而非 DNase 消化），确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。

该试剂盒内独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱，基因组 DNA 被清除而 RNA 穿透滤过。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 H_2O 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 瓶和 70%乙醇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！

◇ 样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时应使用较少的样品处理量，再根据样品试验情况增加或者减少处理量。

◇ 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。

◇ 所有离心操作步骤，均在室温（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（约 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。
2. 根据细胞的种类和数量，充分重悬在 100 μL（<5×10^8 细胞）/200 μL（5×10^8-7.5×10^8 细胞）TE（已加入溶菌酶）中，或者直接用 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. 短暂离心收集细胞到管底，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。

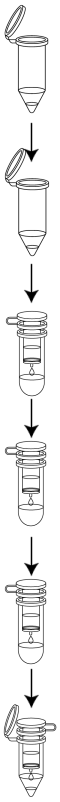
   ▲一般加入裂解液后充分涡旋吹打后应该见不到明显团块或者不溶物，极少数情况下如果有明显团块或者不溶物可以将裂解物 12,500 rpm（14,500×g）离心 3 min，沉淀不能裂解的碎片或者不溶物，取裂解物上清进行下一步。
6. 立刻将裂解物加入一个 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内），12,500 rpm（14,500×g）离心 60 s，保留滤过液（RNA 在滤过液中）。

   ▲确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。

7. 用微量移液器较精确估计滤过液体积（通常为 500 μL，滤过时候损失体积应该减去），加入等体积的 70%乙醇（请先检查是否已加入无水乙醇！），此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。
8. 立刻将混合物（每次小于 700 μL，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×g）离心 60 s，弃掉废液。
9. 加 700 μL 去蛋白液 RW1，12,000 rpm（13,400×g）离心 30 s，弃掉废液。
10. 加入 500 μL 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400×g）离心 30 s，弃掉废液。加入 500 μL 漂洗液 RW，重复一遍。
11. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm（14,500×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。
12. 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℃水浴中加热可提高产量），室温放置 1 min，12,000 rpm（13,400×g）离心 1 min。
13. 如果预期 RNA 产量>30 μg，加 30-50 μL RNase Free H_2O 重复步骤 12，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



收集：离心收集菌体

裂解：100 μL **TE**（<5×10^8个细胞）
200 μL **TE**（5×10^8-7.5×10^8个细胞）
室温温育5min，500 μL**裂解液RLT Plus**
吹打混匀，剧烈振荡20 s充分裂解

DNA清除：立刻转移裂解物至**DNA清除柱**
14,500×g离心60 s，保留滤过液
沉淀：等体积70%乙醇

结合：转移上述混合物至**吸附柱RA**
14,500×g离心60 s

去蛋白：700 μL**去蛋白液RW1**，13,400×g离心30 s
漂洗：500 μL**漂洗液RW**，13,400×g离心30 s，重复一遍
去残留乙醇：14,500×g空甩2 min

洗脱：30 μL-50 μL **RNase Free H_2O**
室温1 min，13,400×g离心1 min
可重复洗脱一次，储存于-70℃

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）

AC0401　SPARKeasy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）