Version 07/21

Flying Shark® Plus Bacteria RNA Kit (gDNA-Filter)

细菌 RNA 提取试剂盒（gDNA 清除柱）

目录号：RNE22

试剂盒组成

Component	RNE22 (50 preps)
Buffer RL	30 ml
70%乙醇	9 ml *（使用前按瓶上标签加入无水乙醇）*
Buffer RW1	25 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml *（使用前按瓶上标签加入无水乙醇）*
RNase-free H_2O	10 ml
gDNA-Filter Columns with Collection Tubes	50
Spin Columns RA with Collection Tubes	50
Buffer EB	10 ml
Lysozyme	30 mg

保存方法

Lysozyme 4℃保存，其他组分室温（15-30℃）。

产品介绍

独特的裂解液迅速裂解细菌并灭活细胞 RNA 酶，使用 gDNA-Filter Columns 去除基因组 DNA，然后用 70%乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下特异性吸附于硅基质膜，再通过两步漂洗步骤，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。提取的 RNA 纯度极高，质量稳定可靠，可直接用于 RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译和分子克隆等多种下游实验。

注意事项

1. 使用 gDNA-Filter Columns 有效去除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化。
2. **第一次使用 70%乙醇和 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。**

操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

✓ **提取细菌 RNA 需先用试剂盒中的 Buffer EB 配制溶菌酶缓冲液，浓度为 1-3 mg/ml。**

1. 12,000 rpm（~13,400×g）离心 2 min 收集 **1-2 ml 菌液**（菌体最大量不超过 1×10^9 细胞），小心去除所有上清，防止残余培养基上清对细胞壁消化过程产生抑制。
2. 向菌体沉淀中加入 100 µl 溶菌酶缓冲液重悬菌体（Buffer EB 中加入溶菌酶配制成溶菌酶缓冲液，浓度为 1-3 mg/ml），室温放置 5 min，其间涡旋混匀数次。破壁完成后 12,000 rpm 离心 30 s，吸弃上清，**涡旋振荡使菌体沉淀松散，有助于下一步裂解**。
   注意：1）一般 G-菌使用 1 mg/ml 溶菌酶缓冲液足够，甚至可以省略破壁步骤。2）一些 G+菌难破壁需要提高溶菌酶浓度（15 mg/ml）、延长破壁时间（10 min）。
3. 加入 **350 µl Buffer RL**，用移液器吸打或涡旋振荡至菌体溶解消失，充分裂解。
4. 将裂解混合物转移到已装入收集管的 gDNA 清除柱（gDNA-Filter Columns）中，12,000 rpm 离心 1 min，弃掉 gDNA-Filter Columns，**保留滤液（RNA 在滤液中）**。
5. 加入与**滤液等体积的 70%乙醇**（通常为 350 µl，*使用前检查是否已加入无水乙醇*），反复吸打混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和可能产生的沉淀转入已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RA）中，12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。
6. 向吸附柱 RA 中加入 **500 µl Buffer RW1**，12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
7. 向吸附柱 RA 中加入 **700 µl Buffer RW2**（使用前检查是否加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。
8. 向吸附柱 RA 中加入 **400 µl Buffer RW2，12,000 rpm 离心 2 min**，确保不残留乙醇，弃掉收集管和废液。
9. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 **30-50 µl RNase-Free H_2O**，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液，-70℃保存。
   注意：RNase-Free H_2O 体积不应少于 30 µl，体积过小影响回收效率。如果要提高 RNA 浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中进行二次洗脱。

附录-难破壁样本的处理步骤：

1. 吸取 350 µl Buffer RL 到一个 RNase-free 离心管中备用。
2. 取 50-100 ml 过夜培养的菌液，10000 rpm（~11,500×g）离心 2 min，收集细菌，尽量去除所有上清液（为确保上清被除尽，可倒置在干净的吸水纸上）。
3. 将适量菌体沉淀转移到研钵中，加入液氮反复研磨成细粉，转移细粉（约黄豆粒大小）至已装入 RL 的离心管中，**振荡混匀，彻底匀浆（不要有聚集成团的菌体块）**。接操作步骤 4 进行后续提取。