

Flying Shark[®] Plus Bacteria RNA Isolation Kit

Flying Shark[®] Plus 细菌 RNA 提取试剂盒

目录号：RNE22

试剂盒组成

| 试剂盒组成 | 保存 | RNE22-01 (50 次) | RNE22-02 (100 次) |
|---|------|--------------------|---------------------|
| Buffer RL | 室温 | 25 ml | 50 ml |
| 70%乙醇 | 室温 | 9 ml | 18 ml |
| Buffer RW1 | 室温 | 25 ml | 50 ml |
| Buffer RW2 | 室温 | 13 ml | 25 ml |
| RNase-free H ₂ O | 室温 | 10 ml | 20 ml |
| Flying Shark [®] gDNA-Filter Columns | 室温 | 50 个 | 100 个 |
| Flying Shark [®] Columns RA | 室温 | 50 个 | 100 个 |
| RNase-free Collection Tubes | 室温 | 100 个 | 200 个 |
| Buffer TE | 室温 | 10 ml | 20 ml |
| Lysozyme (溶菌酶) | -20℃ | 30 mg | 60 mg |
| Manual | | 1 份 | |

保存方法

本试剂盒按指示温度保存 12 个月内效果稳定。



本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品介绍

独特的裂解液迅速裂解菌体细胞和灭活细胞 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，将细菌代谢物、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。提取的 RNA 纯度高，质量稳定可靠，可直接应用于下 RT-PCR、Northern Blot、Dot Blot 和体外翻译等实验。

产品特点

1. 不使用苯酚氯仿，安全无异味。
2. 利用 gDNA-Filter Columns 直接有效去除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化。多次柱漂洗确保 RNA 纯度高，OD260/OD280 典型的比值达 1.9-2.2，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 等各种实验。

标准抽提步骤

- 所有离心步骤均可在室温完成，使用普通台式离心机即可。
 - 第一次使用前请在 70%乙醇和 Buffer RW2 瓶加入指定量无水乙醇！
 - 提取细菌 RNA 需先用试剂盒中的 TE 配制溶菌酶缓冲液，浓度为 1-3 mg/ml。
1. 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 min 收集菌体（菌体最大量不超过 1×10^9 细胞）到一个 1.5 ml 离心管，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. 用含有溶菌酶的 100 μ l TE 缓冲液重悬菌体（TE 中加入溶菌酶，浓度为 1-3 mg/ml），室温放置 5 min 溶解细胞壁，期间涡旋混匀数次帮助破壁。破壁完成后 12,000 rpm 离心 30 s 收集菌体细胞到管底，吸弃上清。
 - 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。
 - 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），或者联合使用石英砂机械破壁，蛋白酶 K 消化等方法。对于金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌等葡萄球菌破壁时，还应加入溶葡萄球菌酶（lysostaphin）至 1 mg/ml，37°C 孵育 15 min 帮助破壁。
 3. 向菌体沉淀中加入 500 μ l Buffer RL，用移液器吸打或涡旋震荡至菌体溶解消失，充分裂解。
 - 一般加入 Buffer RL 涡旋吸打后菌体会全部溶解，如果有不溶性沉淀，可 12,000 rpm 离心 1 min，吸取上清进行下一步操作。
 4. 将裂解物转移到 gDNA-Filter Columns 中（gDNA-Filter Columns 放在收集管内），12,000
-

rpm 离心 1 min, 弃掉 gDNA-Filter Columns, 保留滤液 (RNA 在滤液中)。

- 如果裂解物黏稠导致柱子堵塞, 可提高离心力并延长离心时间, 使液体全部滤过去。
5. 加入与滤液等体积的 70%乙醇 (通常为 500 μ l, 请先检查是否已加入无水乙醇!), 充分混匀 (可能出现絮状沉淀, 不影响后续操作), 将混合物分两次加入至一个 Flying Shark® Columns RA 中 (RA 放入收集管中), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃掉废液。
 6. 向吸附柱 RA 中加入 500 μ l Buffer RW1, 12,000 rpm 离心 30 s, 倒掉废液, 将吸附柱 RA 重新放回收集管中。
 7. 向吸附柱 RA 中加入 600 μ l Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 s, 倒掉废液, 将吸附柱 RA 重新放回收集管中。
 8. 重复步骤 7。
 9. 将吸附柱 RA 放回收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 尽量除尽漂洗液, 弃掉收集管。
 - 这一步的目的是去除吸附柱外壁上可能沾染的以及吸附柱中残余的 RW2, RW2 中乙醇的残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR 等)。
 10. 取出吸附柱 RA, 放入至一个新的 RNase free 离心管中, 向吸附柱的中间部位悬空滴加 30-50 μ l RNase-Free H₂O, 室温放置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集 RNA 溶液。
 - RNase-Free H₂O 提前在 65°C 预热可提高产量。
 - 可以用 30-50 μ l 新的 RNase-Free H₂O 重复步骤 10, 合并两次洗脱液 (可以提高 RNA 的产量, 但 RNA 浓度会降低)。
 - 如果要提高 RNA 的浓度, 可将第一次的洗脱液加回到吸附柱重复离心洗脱一遍。
-
