

FastPure Bacterial RNA Kit Handbook

FastPure 细菌样品 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

FastPure Bacterial RNA Kit		
产品编号	EK-1310-50T	EK-1310-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer RLT	20mL	40mL
Buffer RW1	32mL	64mL
Buffer RPE	12mL	24mL
Lysozyme Solution	6mL	12mL
RNase-Free Water	10mL	20mL
RNase-Free 吸附柱	50 个	100 个
2mL Collection Tubes	50 个	100 个
使用手册	1	1

产品介绍

本试剂盒可以快速地革兰氏阴性及阳性菌 ($\leq 5 \times 10^8$ Cells) 中提取总 RNA, 不含酚氯仿等有毒试剂。其提取的总 RNA 纯度高, 无蛋白质及其它杂质污染, 可用于 RT-PCR、Real Time RT-PCR、mRNA 差异显示、引物延伸分析、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、Slot Blot、Poly A 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。本产品仅供科研使用, 请勿用于医药、临床治疗、食品级化妆品等用途。

存储条件

Lysozyme Solution 置于 -20°C 保存, 其他试剂室温干燥保存可至少稳定 12 个月。

需要额外准备的材料

- 14.3 M β -巯基乙醇(β -ME) (常规购买商业化商品即为 14.3 M)或 2M DTT 溶液
- 70%乙醇: RNase-Free 水配制
- 无水乙醇 (96%-100%)
- 无酶 1.5mL 离心管
- 无酶吸头
- 干净的手套
- 高速离心机

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 操作前在 Buffer RLT 中加入 β -巯基乙醇 (β -ME) 至终浓度为 1% (建议现配现用), 如 1 mL Buffer RLT 中加入 10 μ L β -巯基乙醇 (或 20 μ L 2M DTT 溶液)。配好的 Buffer RLT 可在 4°C 维持稳定一个月。
- Buffer RLT 在储存时可能会形成沉淀, 如果有沉淀出现, 请 37°C 加热溶解后室温使用。
- Buffer RW1 作为浓缩液提供, 在第一次使用前加入 0.25 倍体积的乙醇 (96-100%) 以获得工作溶液。
- Buffer RPE 作为浓缩液提供, 在第一次使用前加入 4 倍体积的乙醇 (96-100%) 以获得工作溶液。
- RNase-Free 水中不含任何抑菌因子, 室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染, 使用时尽量注意, 推荐开瓶后分装保存以减少污染风险保证实验稳定性。
- RNA 在 Buffer RLT 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的无酶离心管或玻璃器皿。
- RNA 提取操作及离心过程室温进行即可。

操作步骤:

1. 取适量菌液于离心机中室温 5,000×g 离心 10min 收集革兰氏阴性或者阳性细菌样品 ($\leq 5 \times 10^8$ Cells)。

若需要处理更多细菌, 则相应增加后续各种试剂用量。

2. 倒弃培养基, 在吸水纸轻轻拍打除尽残液 (或用吸头吸尽)
3. 加入 100 μ L Lysozyme Solution, 通过上下吹打数次小心地重悬沉淀。
若细菌量较大可按细菌量加倍加入溶菌酶的 Buffer TE, 后续 Buffer RLT 也要相应增加体积。
4. 涡旋混匀 10s, 37°C 下孵育 10min。在孵育过程中, 至少每 2min 涡旋 10s 混匀。
5. 加入 350 μ L Buffer RLT (使用前请检查 Buffer RLT 是否加入 β -巯基乙醇或 DTT) 并剧烈振荡。如果可见颗粒物质, 通过离心将其沉淀, 取上清液备用。

6. 添加 250 μ L 体积的无水乙醇于步骤 5 的上清溶液中, 通过移液混匀, 不要离心。

加入乙醇后可能会形成沉淀为正常现象, 这不会影响后续的操作步骤。

7. 将步骤 6 混匀后的溶液转移入 RNase-Free 吸附柱中并套上 2mL 收集管, $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) 离心 30s, 弃废液。

吸附柱最大上柱量为 700 μ L, 若溶液过多可分多次上柱。后续操作若无特殊说明吸附柱均置于 2mL 收集管中。

8. 向吸附柱中加入 700 μ L Buffer RW1 (使用前请确按要加入相应体积无水乙醇), $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) 离心 30s, 弃废液。
9. 将吸附柱重收套回收集管中, 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer RPE (使用前请确按要加入相应体积无水乙醇), $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) 离心 30s, 弃废液。
10. 重复操作步骤 9 一次。

11. 倒弃滤液, 将吸附柱放入收集管中, 以最大转速 ($\sim 13,400 \times g$) 离心 3min 干燥柱子。
12. 将吸附柱套入新的无酶 1.5mL 离心管中, 并置于无酶环境中开盖静置 5-10min 至乙醇晾干。

若吸附柱中残留乙醇将会对纯化后的 RNA 的下游实验造成影响。

13. 向吸附柱膜正中央加入 50-100 μ L RNase-Free Water, 盖上盖子室温静置 2-3 min。后置于最大转速 ($\sim 13,400 \times g$) 离心 3min 得到 RNA 溶液。

RNA 洗脱体积不应少于 30 μ L, 否则影响洗脱效率。洗脱后的 RNA 溶液应立即进行下游实验或置于 -80°C 储存。

常见问题:**1. 柱子堵塞**

- 样品用量太多: 减少样品用量, 参照说明书中提供用量建议。
- 样品消化不充分: 增加 Lysozyme Solution 用量, 延长酶消化孵育时间。

2. RNA 产量低

- 试剂准备有误: Buffer RPE 没有加入乙醇稀释或体积不准确 (乙醇浓度需控制在 80%)。
- 洗脱不充分: 洗脱液需加到膜中央, 增加洗脱体积或次数。

3. RNA 降解严重

- 样品保存有误: 非新鲜现取样品应尽量保存 RNA Holder 等保存液中。
- 提取过程耗材及环境污染: 提取中使用的吸头、离心管等需经无酶处理, 环境应尽量选择无酶环境或洁净环境以减少 RNase 的影响。