

## Bacterial RNA Extraction Mini Kit

### 细菌 RNA 少量提取试剂盒

本产品适合于从细菌培养液样品中提取 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，在高盐条件下特异性结合核酸，并有效去除杂蛋白等细胞中的杂质。试剂盒采用 DNA 过滤技术，可有效去除 DNA。采用该产品提取得到的产物可直接用于 RT-PCR 等下游实验。

#### 产品组份

产品编号	RNB481-01 (10 Preps)	RNB481-02 (50 Preps)	RNB481-03 (250 Preps)
NA Extraction Mini Columns	20	100	500
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer PL	9 ml	40 ml	200 ml
Buffer W1R	10 ml	40 ml	150 ml
Buffer W2R*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Lysozyme	12 mg	70 mg	350 mg
Lysozyme Buffer	2 ml	10 ml	40 ml
RNase Free Water	2 ml	10 ml	50 ml

## 保存条件

本产品除 Lysozyme 外，可在室温(15~25℃)保存 12 个月，长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer PL 可能会有沉淀形成，需 37℃水浴让沉淀完全溶解。

## 准备事项

- Buffer W2R 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

## 实验步骤

1. 转移 0.5-1ml 培养液( $<5 \times 10^8$  个细菌)至 1.5ml 离心管中。4℃，13,000 x g 离心 1 分钟收集细菌，倒弃培养液，加入 100 $\mu$ l Lysozyme，涡旋重悬菌体，室温放置 10 分钟。  
若培养液密度比较大，离心速度和离心时间都可能需要提高，以保证细菌的充分沉淀收集。若需要从菌斑中提取 DNA：用接种环刮下菌斑，并把菌斑转移至 100 $\mu$ l Lysozyme 中，涡旋混匀，室温放置 10 分钟。
2. 加入 600 $\mu$ l Buffer PL 至样品中，高速涡旋 15 秒打散样品，室温静置 5 分钟。  
若存在未充分裂解的沉淀，13,000 $\times$ g 离心 1 分钟。
3. 把 NA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。把第 3 步的上清液转移至柱子中。12,000 x g 离心 1 分钟，弃去柱子，保留滤液。
4. 加入等倍体积 70%乙醇至滤液中，用移液枪吸打 3~5 次，按过柱纯化 RNA 进行操作。

## 过柱纯化 RNA

1. 把 NA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。转移 $\leq 750\mu$ l 混合液至柱子中。12,000 x g 离心 1 分钟。
2. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子。12,000 x g 离心 1 分钟。

3. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer W1R 至柱子上。10,000  $\times$  g 离心 10 秒。
4. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer W2R(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000  $\times$  g 离心 10 秒。
5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer W2R(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000  $\times$  g 离心 10 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟。

该步骤去除 RNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50 $\mu$ l 时，该步骤结束后应打开 RNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

7. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~100 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
柱子最小的洗脱体积是 30 $\mu$ l，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
8. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. RNA 产量低

- 洗脱不充分，延长洗脱时间并增加洗脱次数提高洗脱效率。
- 溶菌酶作用需足够长时间以提高产量。
- 样品用量过多导致裂解不充分，减少样品用量。

### 2. 下游结果不理想

- **乙醇残留**：对于敏感应用，必须晾干 10 分钟后进行洗脱。
- **样品量过多**：超量样品导致纯度下降，减少样品用量。

### 3. 纯度低

- **洗涤不充分**：必要时可进行两次 W1R 洗涤，充分洗去杂质。