

R6950 Bacterial RNA Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书正确配制并保存以下溶液

- 将 15mg/mL 溶菌酶加入到 TE buffer 中溶解，保存到-20℃中
- 使用 Buffer BRK 之前需添加β-巯基乙醇 (β-ME)
- 使用【无水乙醇】对 RNA Wash Buffer II 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
R6950-00	8mL
R6950-01	48mL
R6950-02	48mL (每瓶)

操作步骤:

1. 在 LB 培养基中培养细菌并记录其生长情况 (不要过夜培养);
2. 吸取 3mL 菌液 ($< 5 \times 10^8$ 个细菌) 在 4℃以 5000xg 离心 5-10min, 弃上清;
3. 加入 100μl 已溶解的 Lysozyme/TE Buffer, 涡旋混匀 30s;
4. 30℃水浴 10min, 期间涡旋混匀 2-3 次;
5. 加入 350μl Buffer BRK/β-Me 和 25-40mg Glass powder, 最大速度涡旋 5min, 13,000xg 离心 5min;

Note: 使用 Buffer BRK 之前需添加β-巯基乙醇 (β-ME)

6. 转移 400μl 上清液至一新 1.5mL 离心管, 加入 400μl 70%乙醇吸打混匀;
7. 将 HiBind® RNA Mini column 套于 2mL 收集管中, 转移混合液至柱子中。室温 10,000xg 离心 30-60s, 弃滤液。若混合液超过 700μl, 则每次转移 700μl 至柱子, 然后重复该步骤至所有混合液都滤过结合柱;
8. 将 HiBind® RNA Mini column 套回收集管中, 加入 300μl RNA Wash Buffer I 至柱子上, 室温 10,000xg 离心 30-60s, 弃滤液, 将 HiBind® RNA Mini column 套回收集管中;

Note: 若需要进行膜上 DNase 消化, 按步骤 9 进行, 否则转至第 10 步;

9. (选做) DNase 消化

a. 按照下表比例进行混合

溶液	加入量
OBI DNase I Digestion Buffer	73.5μl
RNase-free DNase I (20 Kunitz unites/μl)	1.5μl
总体积	75μl

- b. 向柱子膜基质上加入 75 μ l 的 DNA 酶混合液;
 - c. 室温 (25-30°C) 放置 15min。
10. 加 500 μ l RNA Wash Buffer I 至柱子, 室温 10,000xg 离心 30-60s, 弃滤液;
11. 将 HiBind[®] RNA Mini 结合柱套回收集管中, 加 500 μ l RNA Wash Buffer II 至柱子上, 室温 10,000xg 离心 30-60s, 弃滤液;
- Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按说明书用无水乙醇稀释
12. 重复步骤 11;
13. 将 HiBind[®] RNA Mini 结合柱套回收集管中, 12,000xg 空柱离心 2min 以干燥结合柱基;
14. 把结合柱装套于新 1.5mL 离心管上, 加入 30-60 μ l DEPC Water 至结合柱基质上, 室温静置 2min, 12,000xg 离心 1min 洗脱获得 RNA。
- Note:如果产量高可进行再加入 30-50 μ l DEPC Water 至柱子基质上,室温静置 2min, 12,000xg 离心 1min 洗脱获得 RNA。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准