**培养细胞、细菌总RNA提取试剂盒**

**（离心柱型）**

**■ 产品简介：**

本产品适用于从各种革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌中提取高纯度细菌总RNA。本试剂盒配有独特的裂解体系，将RNA从菌体中释放出来后在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后由RNase-Free Water将RNA从硅基质膜上洗脱下来。本产品提取RNA方便快捷，无需使用氯仿、苯酚等有毒有害化学物质，对操作人员及实验环境无毒害作用。

**■ 主要成分**：

|  |  |
| --- | --- |
| **产品组成** | **KTSM2909（50次）** |
| 裂解液RG | 30 ml |
| 去蛋白液RD | 16 ml |
| 漂洗液RW | 12 ml |
| RNase-Free-Water | 15 ml |
| DNaseⅠ | 1 ml |
| 10 × DNaseⅠ buffer | 500µl |
| RNase-Free吸附柱R1（含2 ml收集管） | 50个 |
| RNase-Free过滤柱RF（含2 ml收集管） | 50个 |
| RNase-Free离心管（1.5 ml） | 50个 |

**■ 保存条件**：

DNase I，10 × DNase I Buffer 置于-20℃保存；其他溶液于室温（15-25℃）保存。

**■ 自备试剂**：

溶菌酶、β-巯基乙醇、无水乙醇。

**■ 注意事项：**

（1）第一次使用前请先在去蛋白液RD和漂洗液RW瓶中加入指定量无水乙醇，并做好标记。

（2）裂解液RG在使用前请加入β-巯基乙醇至终浓度为1%，如1 ml裂解液RG加10 μl β-巯基乙醇。加入β-巯基乙醇的裂解液RG在4℃可保存1个月，如出现沉淀，请加热溶解后使用。DNase I-20℃保存应避免反复冻融。

（3）裂解液RG和去蛋白液RD中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。

（4）以下操作如非指明，均在室温下进行。

**■ 预防RNase污染：**

（1）全程佩戴一次性手套，经常更换新手套。皮肤经常带有细菌和霉菌，可能污染RNA的抽提并成为RNA酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。

（2）使用无RNA酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在150°C的烘箱中烘烤4 h，塑料器皿可以在0.5 M NaOH中浸泡10 min，用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。

**■ 操作步骤：**

**■ 从培养细胞中提取总RNA：**

1. 收集细胞：

悬浮细胞的收集（收集细胞数量请不要超过1×107）：估计细胞数量，300×g离心5 min，将细胞收集到离心管中，仔细吸除所有培养基上清。  
单层贴壁细胞的收集（收集细胞数量请不要超过1×107）：可直接在培养容器中裂解（容器直径不超过10 cm），或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀。（在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法。）

1. 直接裂解法：确定细胞数量，彻底吸除细胞培养基上清，立即进行第2步裂解步骤。
2. 胰蛋白酶处理法：确定细胞数量，吸除培养基，用PBS洗涤细胞，吸除PBS，向细胞中加入含有0.10-0.25%胰蛋白酶的PBS处理细胞，当细胞脱离容器壁时，加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶，将细胞溶液转移至 RNase-Free 的离心管中，300×g离心5 min，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清。

**注意：收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净，否则会导致裂解不完全，影响RNA与吸附柱的结合，造成RNA的产量降低。**

1. 裂解处理

对于离心得到的细胞沉淀：轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加入适量裂解液RG（见下表，使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇），旋涡震荡。

|  |  |
| --- | --- |
| 沉淀细胞数 | 裂解液RG（ μl） |
| ＜5×106 | 350 |
| 5×106-1×107 | 600 |

对于直接裂解的细胞：RG（见下表，使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇），将细胞裂解液转移至离心管中，涡旋震荡混匀。

|  |  |
| --- | --- |
| 容器直径（cm） | 裂解液RG（ μl） |
| ＜6 | 350 |
| 6-10 | 600 |

1. 将所有溶液转移至过滤柱RF上(过滤柱RF放在收集管中)，12,000 rpm离心2 min，收集滤液。
2. 向滤液中加入1倍体积70%乙醇（通常为350 μl或600 μl），混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱R1中（吸附柱R1放入收集管中），12,000 rpm离心30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱R1放回收集管中。

**注意：配制70%乙醇时请使用 RNase-Free Water，如果滤液体积有所损失，请相应减少70%乙醇用量。将溶液和沉淀转移至吸附柱R1时，如果体积大于吸附柱容量，可以分两次完成。**

1. 向吸附柱R1中加入350 μl去蛋白液RD（使用前请先检查是否已加入乙醇），12,000 rpm离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
2. DNase I工作液的配制：往新的 RNase-Free 离心管中分别加入20 μl DNase I，8 μl 10 × DNase I Buffer 和52 μl RNase-Free Water，轻柔混匀。
3. 向吸附柱R1中央加入80 μl的DNase I工作液，室温放置15 min。
4. 向吸附柱R1中加入350 μl去蛋白液RD，12,000 rpm离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
5. 向吸附柱R1中加入500 μl漂洗液RW（使用前请先检查是否已加入乙醇），室温放置2 min，12,000rpm离心30 sec，倒掉废液，将吸附柱R1放回收集管中。
6. 重复步骤9。
7. 12,000 rpm离心2 min，倒掉废液。将吸附柱R1置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意：此步骤目的是将吸附柱R1中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的RT等实验。**

1. 将吸附柱R1转入一个新的 RNase-Free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100 μl RNase-Free Water，室温放置2 min，12,000 rpm离心2 min，得到RNA溶液。

**注意：洗脱缓冲液体积不应少于30 μl，体积过小影响回收效率。RNA溶液请在-70℃保存。**

**■ 从细菌中提取总RNA：**

1. 收集菌体：将适量菌液置于离心管，4℃ 12,000 rpm离心2 min收集菌体（收集菌体的最大量不超过1×109），仔细去除所有培养基上清。

**注意：如果培养基上清去除不完全，将对第二步中的细胞壁消化过程产生抑制。以后的所有离心步骤均在室温（20-25℃）进行。**

1. 用含有溶菌酶的100 μl EB缓冲液（客户自己配制，配制方法见下表）彻底重悬菌体，孵育时间见下表。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | EB缓冲液中的溶菌酶终浓度 | 孵育时间（室温） |
| G-细菌 | 400 µg/ml | 3-5 min |
| G+细菌 | 3 mg/ml | 5-10 min |

1. 加入350 μl裂解液RG（在使用前请确认是否加入1%β-巯基乙醇），涡旋振荡混匀，若出现不溶性沉淀，12000 rpm离心2 min，将上清转移至另一离心管中。
2. 加入250 μl无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱R1中（吸附柱放在收集管中），12,000 rpm离心30 sec，倒掉废液，将吸附柱R1放回收集管中。
3. 向吸附柱R1中加入350 μl去蛋白液RD（使用前请先检查是否已加入乙醇），12,000 rpm离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
4. DNase I 工作液的配制：往新的 RNase-Free 离心管中分别加入20 μl DNase I，8 μl 10 × DNase I Buffer 和52 μl RNase-Free Water，轻柔混匀。
5. 向吸附柱R1中央加入80 μl的 DNase I工作液，室温放置15 min。
6. 向吸附柱R1中加入350 μl去蛋白液RD，12,000 rpm 离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
7. 向吸附柱R1中加入500 μl漂洗液RW（使用前请先检查是否已加入乙醇），室温放置2 min，12,000 rpm离心30 sec，倒掉废液，将吸附柱R1放回收集管中。
8. 重复步骤 9。
9. 12,000 rpm离心2 min，倒掉废液。将吸附柱R1置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意：此步骤目的是将吸附柱R1中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的RT等实验。**

1. 将吸附柱R1转入一个新的 RNase-Free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100 μl RNase-Free Water，室温放置2 min，12,000 rpm离心2 min，得到RNA溶液。

**注意：洗脱缓冲液体积不应少于30 μl，体积过小影响回收效率。RNA溶液请在-70℃保存。**