**细菌总RNA提取试剂盒（磁珠法）**

**货号：KTSM2915**

**■ 产品简介：**

本试剂盒采用高特异磁珠吸附RNA，配备独特的缓冲液体系，能够有效裂解革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌，从细菌中分离纯化高质量的基因组RNA。高特异性磁珠在一定条件下对核酸具有很强的亲和力，改变缓冲液体系，能够使磁珠释放核酸，达到快速高效分离纯化核酸的效果。

提取过程中不涉及苯酚、氯仿等有机试剂，安全高效。提取的RNA纯度高，无蛋白和DNA污染。

**■ 主要成分**：

|  |  |
| --- | --- |
| **产品组成** | **KTSM2915（50次）** |
| 裂解液RG | 30 ml |
| 洗涤液A | 24 ml |
| 洗涤液B | 12 ml |
| RNase-Free-Water | 15 ml |
| DNaseⅠ | 1 ml |
| 10 × DNaseⅠ buffer | 500 µl |
| 磁珠BB | 1 ml |

**■ 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**：

β-巯基乙醇、无水乙醇。

**■ 注意事项：**

（1）第一次使用前请先在洗涤液A和洗涤液B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和洗涤液A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：**

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。**

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。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 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. 分别加入350 μl裂解液RG（**在使用前请确认是否加入1%β-巯基乙醇**），20 μl磁珠BB和350 μl异丙醇，涡旋振荡5min。
2. 将离心管放在磁力架上磁吸30 sec，弃上清。
3. 加入500 μl洗涤液A (**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**)，颠倒震荡5~10次，然后磁吸弃上清。

**注意：每次加入洗涤液后，盖紧离心管后需轻弹管壁，使磁珠从管壁上脱落分散在洗涤液中。**

1. 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。
2. 向离心管加入80 μl的 DNase I 工作液，轻弹管壁，使磁珠与溶液混合，室温放置15 min。
3. 加入500 μl洗涤液A，颠倒震荡5~10次，然后磁吸弃上清。
4. 加入洗涤液B (**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**)，颠倒混匀5~10次，然后磁吸弃上清。
5. 重复步骤9。
6. 将离心管放置室温干燥5~10 min。
7. 加入50~100 μl RNase-free Water，缓慢颠倒混匀，56℃水浴5 min，期间轻摇离心管混匀，然后磁吸分离，小心吸取上清液至新的离心管中，该液体即为提取的细菌总RNA溶液。