

ABC[®] 磁珠法细菌总 RNA 提取试剂盒

目录号：ABC3635

产品信息

产品名称	产品编号	规格
磁珠法细菌总 RNA 提取试剂盒	ABC3635-50T	50T

产品简介

本试剂盒适用于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的 RNA 提取，利用超顺性磁珠可逆的结合核酸的特性，再搭配精心优化的裂解缓冲液体系，可快速、有效地分离出细菌中的 RNA，提取过程可在 30-40 min 内完成，得到的 RNA 完整性好、纯度高、产量大，适用于 RT-PCR、Real-Time PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游分子生物学实验。

储存与运输

Lysozyme (50 mg/mL)、DTT solution 和 DNase 冰袋 (wet ice) 运输，-20°C 保存；其它试剂室温运输，室温储存，有效期 12 个月。

组成

Component Number	Component	ABC3635-50T
ABC3635-1	Lysozyme (50 mg/mL)	500 μ L
ABC3635-2	Buffer GRL	10 mL
ABC3635-3	Buffer RW1	12 mL
ABC3635-4	Buffer RW2	16 mL
ABC3635-5	DNase	250 μ L
ABC3635-6	10 \times DNase Buffer	500 μ L
ABC3635-7	DTT Solution	400 μ L
ABC3635-8	Nuclease-free Water	10 mL
ABC3635-9	SweMag Beads	1 mL
说明书		1 份

使用前准备

1. 请自备 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)，用于重悬收集的细菌菌体和稀释溶菌酶。
2. 若提取革兰氏阳性菌 RNA，请提前准备 37°C 的水浴或加热块。
3. 若 Buffer GRL 出现沉淀，请于 37°C 加热溶解，待恢复至室温后使用。
4. 请在使用前向 Buffer GRL 加入 DTT Solution 至 4%，即每 1 mL Buffer GRL 加 40 μ L DTT Solution，最好现用现配，加入 DTT Solution 的 Buffer GRL 可于 4°C 保存 1 周。
5. DNase 工作液现用现配。
6. 使用前请向 Buffer RW1 中加入 18 mL 无水乙醇，混合均匀后使用。
7. 使用前请向 Buffer RW2 中加入 64 mL 无水乙醇，混合均匀后使用。

操作步骤

1. 取 1-3 mL 菌液 (细菌总量不超过 1×10^9)，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 4°C 离心 2 min 收集菌体；
注：上清请务必去除干净，否则会影响细菌细胞壁的消化。
注：菌体不宜过量，否则会造成产量降低、基因组残留以及蛋白污染等问题，当 OD₆₀₀=1 时建议取 1 mL 的菌液量。

2. 将菌体重悬于 100 μ L 含溶菌酶的 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中, 溶菌酶浓度及孵育条件见下表:

细菌类别	溶菌酶浓度	孵育温度	孵育时间
革兰氏阴性菌 (G-)	0.4 mg/mL	室温	3-5 min
革兰氏阳性菌 (G+)	5 mg/mL	37°C	5-10 min

- 向孵育后的细菌悬液中加入 200 μ L Buffer GRL (使用前请确认已加入 DTT solution), 涡旋振荡混匀;
- 向离心管中加入 300 μ L 无水乙醇, 使用移液器吹打混匀 (可能会出现沉淀);
- 向混合液中加入 20 μ L SweMag Beads (SweMag Beads 使用前需涡旋至分散均匀), 使用移液器吹打至磁珠分散均匀, 室温静置 5 min, 期间使用移液器吹打混匀 2-3 次, 使磁珠保持分散均匀的状态;
- 将离心管移至磁力架上静置 30 s, 使磁珠吸附至管壁, 待上清清澈后, 吸弃上清 (为避免影响提取效率, 勿将磁珠吸出), 将离心管从磁力架上取下;
- 向离心管中加入 500 μ L Buffer RW1, 使用移液器吹打至磁珠分散均匀, 再将离心管移至磁力架上静置 30 s, 使磁珠吸附到管壁, 待上清清澈后, 吸弃上清 (为避免影响提取效率, 勿将磁珠吸出), 将离心管从磁力架上取下;
- 向离心管中加入 600 μ L Buffer RW2, 用移液器吹打至磁珠分散均匀, 再将离心管移至磁力架上静置 30 s, 使磁珠吸附到管壁, 待上清清澈后, 吸弃上清 (为避免影响提取效率, 勿将磁珠吸出), 将离心管从磁力架上取下;
- 配制 DNase 工作液: 取 85 μ L Nuclease-free Water、10 μ L 10 \times DNase Buffer 和 5 μ L DNase 置于一个新的 Nuclease-free 离心管中, 使用移液器轻轻吹打混匀;
- 将 DNase 工作液沿管壁加入到离心管中, 将管壁的磁珠冲刷下来并使用移液器轻轻吹打混匀, 室温放置 15 min, 期间使用移液器多次吹打混匀;
- 向离心管中加入 600 μ L Buffer RW2, 用移液器吹打至磁珠分散均匀, 再将离心管移至磁力架上静置 30 s, 使磁珠吸附到管壁, 待上清清澈后, 吸弃上清 (为避免影响提取效率, 勿将磁珠吸出);
- 重复操作步骤 11;
- 将离心管盖打开, 置于超净工作台中放置 5-10 min, 使乙醇完全挥发 (请勿使磁珠过度干燥, 以免磁珠结块影响核酸得率);
- 将离心管从磁力架上取下, 向离心管中加入 50-100 μ L Nuclease-free Water, 用移液器轻轻吹打至磁珠分散均匀, 室温静置 3-5 min, 期间使用移液器吹打混匀 2-3 次;
- 将离心管置于磁力架上, 直至磁珠完全吸附, 吸取上清至一新的离心管中, 即得高纯度的 RNA;
- 得到的 RNA 溶液请于 -80°C 保存。

注意事项

- 操作之前, 请务必认真阅读本产品说明书。
- 实验时应穿实验服, 戴一次性手套, 佩戴口罩, 避免讲话, 提取 RNA 过程中所使用的器具和配制溶液所用的水或试剂请确保为 Nuclease-free 的制品。
- 不同细菌细胞壁的酶解难易程度不同, 革兰氏阳性菌细胞壁一般较难酶解, 客户可根据细菌种类调整溶菌酶浓度和孵育时间。
- 部分试剂易挥发和氧化, 应避免试剂长时间暴露于空气中, 各试剂使用后应及时盖紧盖子。
- 应使用 RNA 提取专用操作实验台与电泳设备。

产品仅供科研用途, 不用于临床诊断!