

版本号:220818

Bacteria microRNA Kit**细菌 microRNA 快速提取试剂盒 (免氯仿)**

目录号: RN63

❖ 适用范围:

适用于细菌/外泌体等提取microRNA/总RNA。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次(RN6301)
裂解液 BRL	室温	25 ml
溶菌酶	4℃	20 mg
TE(PH 8.0)	室温	6 ml 12 ml
Wash Solution 1	室温	第一次使用前加入 28ml 无水乙醇 10 ml
Wash Solution 2/3	室温	第一次使用前加入 42ml 无水乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
基因组 DNA 清除柱 和收集管	室温	50 套
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在 37℃ 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温 (4℃ 或者 -20℃) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果, 因此运输和储存均在室温下 (15℃-25℃) 进行。
3. Wash Solution 2/3 可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体, 并不影响使用, 直接不吸晶体, 吸上清使用就可以。
4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍:

传统的 microRNA 提取试剂盒均是采用异硫氰酸胍/苯酚/氯仿 (TRIzol 法) 加高浓度乙醇硅胶膜吸附小片段 microRNA 的原理方法制成。但是该方法使用的苯酚/氯仿因其对身体的毒性致癌作用和环境保护受到越来越多的限制。同时 Trizol 法原理适用范围窄, 对于某些样品包括细菌样品, 提取 microRNA 效果不佳。

而本试剂盒在公司领先 RNA/microRNA 提取技术的基础上, 创新性的采用了不用苯酚, 氯仿的技术路线解决该问题。独特的通用裂解液迅速裂解细菌和灭活细菌 RNA 酶, 然后裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱, 基因组 DNA 被清除而 RNA (包括 microRNA) 被选择性滤过。滤过的 RNA/microRNA 用乙醇调节结合条件后, 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列特殊漂洗液快速的漂洗—离心的步骤, 将细胞代谢物和蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA (包括 microRNA) 从硅基质膜上洗脱。

产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚, 氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速简捷, 比传统 microRNA 提取试剂盒大大减少了操作时间和步骤。
3. 既可以得到总 RNA (包含了 microRNA), 也可以采用分提取操作步骤单独纯化富集后的 microRNA 组分和总 RNA (>200 nt) 从而得到分离富集的 microRNA 和 RNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.0~2.2, 可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

❖ 注意事项

1. **所有的离心步骤均可在室温完成**, 使用转速可以达到12,000 rpm的传统台式离心机。
2. 需要自备乙醇、Lysostaphin (样品为金葡菌时需准备)。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱DA和和RNA吸附柱RA处理能力, 否则造成DNA残留或产量降低。开始摸索实验条件时, 如果不清楚样品DNA/RNA含量时可使用较少的样品处理量, 将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
4. 裂解液BRL 和Wash Solution 1中含有刺激性化合物, 操作时戴乳胶手套, **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。**

5. 关于DNA 的微量残留:

一般说来任何总RNA提取试剂在提取过程中无法完全避免DNA的微量残留(DNase消化也无法做到100%无残留),该产品由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组DNA清除柱技术,绝大多数DNA已经被清除,个别特殊情况需要清除微量基因组DNA残留,可使用以下几种DNA酶消化的方式。

- 1) 传统DNA酶消化提取的RNA/microRNA,热灭活DNA酶后直接用于后续实验。
- 2) 传统DNA酶消化提取的RNA/microRNA,然后按照**RNaclean Plus 增强型RNA清洁纯化试剂盒(含小RNA)**(货号:RN62)纯化回收。
- 3) 直接在吸附柱RA上进行DNase I柱上消化处理。购买DNA酶柱上消化试剂盒(货号:RN34,但是需将说明书的去蛋白液RW1改成Wash Solution 1)可先索取具体操作说明书。

❖ 操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

提示:

- ⇒ 第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶加入指定量无水乙醇!
- ⇒ 提取细菌 RNA 需先配制加了溶菌酶或者 Lysostaphin 的 TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), TE 中已加入溶菌酶或者 Lysostaphin, 浓度为 1mg/ml。

(一) 样品处理

1. 离心收集 1-2ml 菌液(10^8 - 10^9 细胞)到一个 1.5 ml 离心管,尽可能去除上清。
2. 根据细胞的种类和数量,充分重悬细胞在 100 μ l (5×10^8 细胞)/ 200 μ l (5×10^8 - 7.5×10^8 细胞) TE 中(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), TE 中已加入溶菌酶或者 Lysostaphin, 浓度为 1mg/ml, 或者直接用 TE 重悬后,用干净枪头挑取少许溶菌酶加入。
3. 室温(15-25 $^{\circ}$ C)温育 5 分钟/溶菌酶,或者 37 $^{\circ}$ C温育 15 分钟/ Lysostaphin, 破解细胞壁。每 2 分钟涡旋振荡 10 秒帮助破壁。

注意各种细菌破壁的难易程度不一样,一般革兰氏阴性菌 E.coli 使用上面的条件就足够了,甚至可能省略该步骤,但是某些革兰氏阳性菌如 B. subtilis 难破壁需要提高溶菌酶浓度到 15mg/ml 和温育时间到 10 分钟。如果金黄色葡萄球菌需要加入 lysostaphin 到 1mg/ml, 37 $^{\circ}$ C温育 15 分钟。总之不同细菌类型破壁难易程度不同,有的难破壁的种类需要根据用户自己的具体情况调节酶的种类、工作浓度

和温育温度、时间，此外还可以联合使用玻璃珠击打，机械破壁，蛋白酶 K 消化等方法帮助破壁。

4. 短暂离心收集细菌，彻底弃上清后加 500 μ l 裂解液 BRL 涡旋震荡或者吹打裂解细菌。

(二) 总 RNA (包含 microRNA) 提取

1. 将裂解匀浆液全部加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内)。立即 12,000 rpm 离心 1 min, 收集滤液 (RNA/microRNA 在滤液中)。
2. 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (480 μ l 左右, 滤过时候损失体积应该减去), 加入 1.25 倍体积的无水乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。
3. 立刻将混合物 (每次小于 700 μ l, 多可以分两次加入) 加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。

确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。

4. 加 700 μ l Wash Solution 1 (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
5. 加入 500 μ l Wash Solution 2/3 (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。加入 500 μ l Wash Solution 2/3, 重复一遍。
6. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
7. 取出吸附柱 RA, 放入一个 1.5ml 新离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l RNase free water, 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。
将洗脱液加回到吸附柱重复洗脱步骤一遍可以提高产量约 10-15%。
8. 得到的 RNA/microRNA 可以立即用于下游反应或者尽快置于低温保存。

附录 1: microRNA 相对富集方法 (microRNA/去除了 microRNA 的总 RNA 分别提取)

提示:

- ⇒ 第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶加入指定量无水乙醇!
- ⇒ 提取细菌 RNA 需先配制加了溶菌酶或者 Lysostaphin 的 TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), TE 中已加入溶菌酶或者 Lysostaphin, 浓度为 1mg/ml。

1. 首先按照 (一) **样品处理** 准备好裂解匀浆液。
2. 在裂解匀浆液加入一半体积的无水乙醇(**0.5 体积**), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。
3. 将混合物(每次小于 720 μ l, 多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱中, (清除柱放入收集管中) 12,000 rpm 离心 2 分钟, **保留滤液 (microRNA 在滤液中)**。
此时, 滤过液含有 microRNA, 基因组 DNA 清除柱子上面是去除了 microRNA 的总 RNA (不包含 microRNA), 如果需要, 可以按照前面标准操作步骤 4-8 操作漂洗, 洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。
6. 用微量移液器较精确估计滤过液体积, 加入等体积无水乙醇 (必须是室温的), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。
7. 立刻将混合物(每次小于 700 μ l, 多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 12,000 rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。
确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。
8. 按照前面标准操作步骤 4-8 操作漂洗, 洗脱得到富集的 microRNA。

注意: 不同的实验可以选择不同的方法, 例如Northern Blot或者表达芯片谱分析可以选择提取包括microRNA的总RNA。相对富集方法提取的microRNA因为去除了较大片段的mRNA和rRNA等, 可能减少某些下游试验的扩增背景, 当背景较高或者非特异扩增较多时, 可以尝试使用相对富集方法提取的microRNA。总的原则是首选提取使用总RNA(包含了microRNA)做实验, 只有确实使用总RNA(包含microRNA)效果不佳的时候, 或者实验设计要求必须富集分离microRNA和mRNA, 才尝试采用富集microRNA的方法。

附录 2: DNA 酶柱上消化 (详细请参考 RN34 DNase I 柱上消化试剂盒说明书)

1. 按照前面所列操作步骤操作, 直到做完操作步骤 3。
2. 取 45 μ l DNase I buffer 和 5 μ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液 (处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液)。
3. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l Wash Solution 1, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
4. 向吸附柱 RA 中央加入 50 μ l 的 DNase I 工作液, 室温 (20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C) 放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上向膜四周浸润充分和膜接触, 不要让工作液滴在 O 型垫圈或是离心柱管壁上挂壁或者挂在垫圈上不能充分和膜接触。
5. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l Wash Solution 1, 12,000 rpm 离心 30-60 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
6. 接操作步骤 5 完成后续步骤。