

细菌microRNA快速提取试剂盒

KR202 50次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次
裂解液 BRL	室温	25 ml
溶菌酶	4°C	20 mg
TE(PH 8.0)	室温	6 ml
Wash Solution 1	室温	12 ml 第一次使用前加入 28ml 无水乙醇
Wash Solution 2/3	室温	10 ml 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. 溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 低温 (4°C 或者 -20°C) 会造成溶液沉淀, 因此运输和储存均在室温下 (15°C - 25°C) 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, 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:

独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 植物 RNA 助提剂 PLANTaid 帮助结合多糖多酚并通过离心去除, 然后裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱, 基因组 DNA 和去除了 microRNA 的总 RNA 被清除,

而 microRNA 被选择性滤过。滤过的 microRNA 用乙醇调节结合条件后, microRNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列特殊漂洗液快速的漂洗 - 离心的步骤, 将细胞代谢物, 蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 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, 单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 独有的植物 RNA 助提剂可以有效结合多糖多酚, 提高清除效果。
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 (4°C 离心也可以)**, 使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机。
2. 需要自备乙醇, β-巯基乙醇, 研钵(可选)。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱 DA 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 RLT Plus 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), 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 DNA 酶柱上消化 (见附录 1)

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

⇒ 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的 TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA),

⇒ 溶菌酶的 TE 浓度为 1mg/ml (即称取 6 毫克溶菌酶加入到 6 毫升 TE 溶液中)

(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 5-10 分钟/溶菌酶, 破解细胞壁。每 2 分钟涡旋振荡 10 秒帮助破壁。
4. 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, 甚至可以省略该步骤, 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 (需要自己配置) 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, 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。
5. 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。
6. 将混合物(每次小于 720 μ l, 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 清除柱上面是去除了 microRNA 的总 RNA (不包含 microRNA)**
7. 在裂解匀浆液 (滤液) 中加入一半体积的无水乙醇(**0.5 体积**), 可能出现沉淀, 立即吹打混匀, 不要离心。
8. 立刻将混合物(每次小于 700 μ l, 可以分两次加入一个吸附柱 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。
9. 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。

10. 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。
11. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 除去漂洗液, 以免乙醇抑制下游反应。
12. 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。
13. 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%。
14. 得到的 microRNA 可以立即用于下游反应或者尽快置于低温保存。

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(可索要相应操作步骤)。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。

附录 1: DNA 酶柱上消化

1. 按照前面所列操作步骤操作,直到做完操作步骤 6。
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。
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 8 完成后续步骤。