

# AipPure 细菌 miRNA 快速提取试剂盒(离心柱型)

## AipPure Bacterial miRNA Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

### 使用说明书

- ◆版本号：231103
- ◆目录号：MR208
- ◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(MR208-01)
裂解液 ALB	室温	25mL
溶菌酶	4℃	20mg
TE 溶液(PH8.0)	室温	6mL
Wash Solution 1	室温	12mL 第一次使用前加入 28mL 无水乙醇
Wash Solution 2/3	室温	10mL 第一次使用前加入 42mL 无水乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
基因组 DNA 清除柱和收集管	室温	50 套
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	50 套

- ◆适用范围 适用于快速提取细菌/外泌体等 microRNA 或 microRNA/总 RNA 分别提取。
- ◆产品储存：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。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。
- ◆产品介绍：

本试剂盒在我公司领先的 RNA/microRNA 提取技术的基础上，创新性的采用了不用苯酚、氯仿等有毒试剂的技术路线，精心研制而成。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，但是该方法因为使用了有毒的苯酚/氯仿，因其对身体的毒性致癌作用和环境保护的影响受到越来越多的限制。同时 TRIZOL 法原理适用范围窄，对于某些特殊样品(包括细菌样本)，提取 microRNA 效果不佳。

本试剂盒配备了独特的通用裂解液，可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 Water 将纯净的 RNA(包括 microRNA)从硅基质膜上洗脱。

本试剂盒采用分提取操作步骤也可单独纯化富集后的 microRNA 组分和总 RNA(>200 nt)，从而得到分离富集的 microRNA 和 RNA。

## ◆产品特点：

1. 操作安全，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，全程操作只需 12 步，单个样品操作一般可在 40 分钟内完成，比传统 microRNA 提取试剂盒大大减少了操作时间和步骤。
3. 功能强大，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(>200nt)，从而得到分离富集的 microRNA 和 RNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 典型的比值达 2.0~2.2，可直接用于 RT-PCR、荧光定量 PCR、Northern-Blot 等相关分子生物学实验。

## ◆注意事项：

1. 第一次使用前请先在 Wash Solution 1 瓶和 Wash Solution 2/3 瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入。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，吸上清使用即可。
2. 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。
3. 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密封保存。
4. 所有的离心步骤均可在室温完成(4℃ 离心也可以)，使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机。
5. 需要自备乙醇，研钵(可选)、Lysostaphin(样品为金葡萄菌时需准备)等。
6. 样品处理量绝对不要超过基因组 DNA 清除柱和 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。
7. 裂解液 ALB 和 Wash Solution 1 中含有刺激性化合物，操作时需穿防护服并佩戴一次性手套，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。
8. 预防 RNase 污染及实验前的准备：经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能

导致 RNase 污染。使用 RNase-free 的塑料制品和枪头避免交叉污染。RNA 提取过程中应使用 RNase-free 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150°C 烘烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。配制溶液应使用 RNase-free 的水或 DEPC 水(DEPC 水的制备：将水加入到干净玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v)，37°C 放置过夜，高压灭菌)。

9. 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，然后使用增强型 RNA 清洁纯化试剂盒(货号：RE282)清洁纯化后用于后续实验。
  - 3) 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 柱上消化处理。可购买爱普科学的 AipPure DNase I 柱上消化试剂盒(RNase-free)(货号：RE280)，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(提取包含 microRNA 的总 RNA)：

**提示：**第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶中按照标签提示加入指定量无水乙醇！并打钩做好标记避免重复加入！提取细菌 RNA 需先配制加了溶菌酶或 Lysostaphin 的 TE 溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)，确保 TE 溶液中已加入溶菌酶或 Lysostaphin(浓度为 1mg/mL)。

1. 离心收集 1-2mL 菌液( $10^8$ - $10^9$  细胞)到新的 1.5mL 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 $\mu$ L( $5 \times 10^8$  细胞)/200 $\mu$ L( $5 \times 10^8$ - $7.5 \times 10^8$  细胞)TE 溶液中(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)，确保 TE 溶液中已加入溶菌酶或 Lysostaphin(浓度为 1mg/mL)或者直接用 TE 溶液重悬后，用干净枪头挑取少许溶菌酶加入。
3. 室温(15-25°C)温育 5 分钟/溶菌酶，或者 37°C 温育 15 分钟/Lysostaphin，破解细胞壁，期间每 2 分钟涡旋振荡 10 秒辅助破壁。

**注：**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°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、温育温度和时间的等，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，彻底弃上清后加入 500 $\mu$ L 裂解液 ALB，涡旋振荡或者用吸头吹打混匀帮助裂解细菌。
5. 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 12,000rpm 离心 1 分钟，收集滤液(RNA/microRNA 在滤液中)。
6. 用微量移液器较精确估计滤过液体积(480 $\mu$ L 左右，滤过时损失体积应该减去)，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。
7. 立刻将混合物(每次小于 700 $\mu$ 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)12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

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

8. 加入 700 $\mu$ 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。
9. 加入 500 $\mu$ L Wash Solution 2/3(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500 $\mu$ L Wash Solution 2/3，重复操作一遍。
10. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000rpm 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。
11. 取出吸附柱 RA，放入新的 RNase-free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 $\mu$ L RNase-free Water，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟，洗脱收集 RNA 溶液，得到的 RNA/microRNA 可以立即用于下游反应或尽快-70 $^{\circ}$ C 保存，防止降解。

**注：**将洗脱液重新加回到吸附柱按照步骤 11 重新洗脱一遍，可以提高产量约 10-15%。如果预期 RNA 产量>30 $\mu$ g，加 30-50 $\mu$ L RNase-free Water 重复步骤 11 操作，合并两次洗脱液，分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%，但是浓度要低，用户根据实验需要自行选择。

#### 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 瓶中按照标签提示加入指定量无水乙醇！并打钩做好标记避免重复加入！提取细菌 RNA 需先配制加了溶菌酶或 Lysostaphin 的 TE 溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)，确保 TE 溶液中已加入溶菌酶或 Lysostaphin(浓度为 1mg/mL)。

1. 按照标准操作步骤 1-4，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 $\mu$ L, 多可以分两次加入)加入一个基因组 DNA 清除柱中, (清除柱放入收集管中)12,000rpm 离心 2 分钟, 保留滤液(microRNA 在滤液中)。

**注:** 此时滤过液含有 microRNA, 基因组 DNA 清除柱内溶液是去除了 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。

4. 将混合物(每次小于 720 $\mu$ 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)13,000rpm 离心 2 分钟, 保留滤液(microRNA 在滤液中)。

**注:** 此时滤过液含有 microRNA, 基因组 DNA 清除柱内溶液是去除了 microRNA 的总 RNA(不包含 microRNA), 如果需要, 可以按照前面标准操作步骤 8-11 操作, 漂洗、洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。

5. 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!), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。

6. 立刻将混合物(每次小于 700 $\mu$ 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)13,000rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。

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

7. 按照前面标准操作步骤 8-11 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 RE280/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 1-7。

2. 取 45 $\mu$ L DNase I Buffer 和 5 $\mu$ L RNase-free DNase I 在离心管内轻轻吹打混匀, 配制 DNase I 工作液

**注:** 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 $\mu$ L Wash Solution 1, 12,000rpm 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 $\mu$ L 的 DNase I 工作液, 室温(20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C)放置 15 分钟。

**注** 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 型垫圈上，或离心柱管壁上挂壁，或挂在垫圈上不能充分和膜接触。

5. 向吸附柱 RA 中加入 350 $\mu$ L Wash Solution 1，12,000rpm 离心 30-60 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. 立即接操作步骤 9，完成后续实验步骤。

=====

