



ANBIOSCI TECH LTD



PowerMicrobiome™ RNA Isolation Kit

粪便 RNA 提取试剂盒

货号	提取次数
26000-50	50 次

简介

PowerMicrobiome™ RNA Isolation Kit 设计用于简便快速提取粪便、肠内容物、干粪、口腔棉拭子、分泌物等富含 PCR 抑制因子样本总 RNA。专利 IRT 技术 (Inhibitor Removal Technology®) 能完全去除这些样本中含有的 PCR 抑制物, 如未完全消化的植物成分、裂解红细胞的亚铁血红素等。试剂盒含 DNase I 及相应试剂, 可去除可能污染的基因组 DNA。最终 RNA 洗脱浓缩在 RNase-free Water 中, 可直接用于 cDNA synthesis 或 RT-qPCR 等下游实验。

操作预览

建议粪便或生物固体加样 0.25g。粪便采样后尽快-80℃保存, 以保护 RNA 完整性。

化学裂解缓冲液与 0.1mm 玻璃研磨珠, 共同作用充分裂解微生物细胞。绑定液 (PM3) 把 RNA 吸附到离心柱滤膜上, DNase 消化残余的基因组 DNA 后, 冲洗并洗脱到 RNase-free Water 中, 最终 RNA 可直接用于 RT-qPCR 等下游实验。

若实验要求 RNA 需要再一步 DNase 处理, 建议使用 DNase Max™ Kit (货号: 15200-50), 一种全新的室温稳定保存的 DNase 完全去除基因组 DNA。只需 20min 即可消化掉 30 μg DNA, 无需加热或 EDTA 干扰, 采用特制的树脂能轻易去除 DNase 酶。使用 DNase Max™ Kit 处理完以后, RNA 仍能保持原有的高质量。

相关产品	货号	数量
DNase Max™ Kit	15200-50	50 次
Vortex Adapter, holds 24 (1.5-2.0 ml) tubes	13000-V1-24	1 unit

样本储存与保护

从粪便微生物中提取的 RNA 的得率和完整性很大程度上受个体消化系统功能、特定饮食菜单以及收集样本到-80℃保存耗时长短影响。粪便主要成分是水 (65-85%)、未完全消化食物、胆汁、胆红素 (由死亡红细胞衍生) 和死亡细菌 (可达 50%) 等。因为存在大量的死亡或濒死细菌及人体细胞, 从粪便中提取的 RNA 用标准分析方法鉴定能看到一定程度的降解。QPCR 检测从粪便或肠内容物提取的 RNA 应注意设计检测小片段 RNA, 以提高检测的灵敏度。

为了提供粪便 RNA 的质量, 最好采集后尽快处理。可分装后-80℃冷冻, 避免大块样本反复冻融。从冰箱中取出的样本, 完全溶解前就可以加入含 β ME 的 PM2 裂解缓冲液到 Bead Tube 中。马上加样开始研磨以促使保护液能充分浸泡到细胞 RNA。新鲜采集未经冷冻的样品, 也应该立即加入裂解缓冲液进行研磨, 以获得最好质量的 RNA。

设备要求:

微型离心机 (13000g)

Vortex-Genie®2 涡旋仪 (MO BIO 货号#13111-V-220)

涡旋仪适配器 (MO BIO 货号# 13000-V1-24)



ANBIOSCI TECH LTD

自备试剂:

β 巯基乙醇

选用试剂:

苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) pH6.7-8.0 (Amresco 货号: 0883-100,0883-400)

试剂盒组分

	货号: 26000-50
组分	量
Glass Bead Tubes, 0.1mm	50
Solution PM1	36 ml
Solution PM2	11 ml
Solution PM3	36 ml
Solution PM4	3 $\times$ 24 ml
Solution PM5	3 $\times$ 24 ml
Solution PM6	2.5 ml
Solution PM7	23 ml
Solution PM8	5.5ml
DNase I (RNase-Free), 15000units	1 vial
Spin Filters	50
2 ml Collection Tubes	200

△实验前请先逐一检查试剂!

保存

DNase I 4℃保存, 重悬分装后-20℃保存。其它组分室温 (15-30℃) 保存。

实验开始前注意事项

PM1 使用前必须 55-60℃水浴至完全没有沉淀, 可趁热使用。PM5 使用前摇匀。

β 巯基乙醇加入到 PM1, 制备 PM1/ β ME 溶液

把 β 巯基乙醇 (β ME) 加入到 PM1 溶液中, 使最终浓度达到 10 μ /ml。PM1/ μ ME 溶液随着时间推移会失效, 最好现配现用, 保存时间不要超过一个月。每次提取需要 650 μ l PM1/ β ME 溶液。也可以直接把 650 μ l PM1 溶液和 6.5 μ l β ME 加入到玻璃珠研磨管中。

注意: 处理 β ME 时请在通风橱中进行。

制备 DNase I

A. 把 300 μ l RNase-FreeWater (PM8 溶液) 加入到 DNase I (RNase-Free) 冻干粉中, 轻摇混匀。以 50 μ l 分装, -20℃保存。

注意: DNase I 不能反复冻融超过 3 遍。

B. 在实验前制备 DNase I 溶液, 化冻足够量的 DNase I, 每次提取需要 5 μ l 一地步稀释保存的 DNase I 和 45 μ l



ANBIOSCI TECH LTD

的 PM6。

如:

样品数量	稀释保存的 DNase I	PM6 溶液
1	5 μ l	45 μ l
2	10 μ l	90 μ l
10	50 μ l	450 μ l

深圳市安必胜科技有限公司



ANBIOSCI TECH LTD

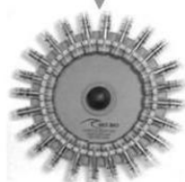
PowerMicrobiome™ RNA Isolation Kit

Prepare Sample



- Add stool or biosolid sample into the Glass Bead Tube, 0.1 mm
- Add Solution PM1/βME

Cell Lysis



- Attach to Vortex Adapter
- Vortex

Centrifuge

Inhibitor Removal Technology®



- Add Solution PM2
- Incubate at 4°C

Centrifuge

Bind RNA



- Add Solution PM3 and PM4
- Load into Spin Filter

Centrifuge

Wash



- Wash with Solution PM5

Centrifuge

Removal of DNA



- Add DNase I Solution (PM6 mixed with DNase I stock solution)
- Incubate at room temperature
- Add Solution PM7

Centrifuge

Wash



- Wash with Solution PM5
- Wash with Solution PM4

Centrifuge

Elute



- Elute with Solution PM8



操作步骤

1. 加入 0.25g 粪便或生物固体 (biosolid) 到 **Glass Bead Tube, 0.1mm** 中。

注意: 若希望用苯酚裂解法, 加样前加入 500 μ l 苯酚/氯仿/异戊醇 pH6.5-8.0 到 Bead Tube 中。

2. 加入 650 μ l **PM1/ β ME** (见前文制备步骤) 到 Glass Bead Tube, 0.1mm 中。或直接加入 650 μ l **PM1** 和 6.5 μ l 到 Glass Bead Tube 中。
3. 把 Glass Bead Tube, 0.1mm 固定在 MOBIO 涡旋仪适配器上 (货号 13000-V1-24)。Tube 管螺帽调整, 朝适配器中心方向。
4. 最大转速连续涡旋振荡 10min。

这一步发生了什么: 化学裂解液和珠磨研磨同时裂解破碎细胞。裂解液还能保护释放到上清液中的 RNA。

5. 室温 13000g 离心 1min。把上清转移到一个干净的 2ml 收集管中 (试剂盒提供)。约可获得 500-600 μ l 上清。若加入的是把苯酚/氯仿/异戊醇, 把上分离层转移到一个干净的 2ml 收集管中。

这一步发生了什么: 蛋白、细胞碎片与研磨珠一起沉淀下来, 上清中含有人类和细菌 RNA 及 DNA。

6. 加入 150 μ l **PM2 溶液**, 稍微涡旋混匀。4 $^{\circ}$ C 孵育 5min。

这一步发生了什么: PM2 溶液为抑制因子去除溶液, 作为 IRT 技术一部分可完全去除样品很重含有的抑制下游 PCR 及其它应用的抑制因子。

7. 13000g 离心 1min。
8. 避开底部沉淀, 转移不多于 650 μ l 上清到一个干净的 2ml 收集管中 (试剂盒提供)。
9. 加入 650 μ l **PM3 溶液**和 650 μ l **PM4 溶液**, 稍微涡旋混匀。

注意: 为了防止小片段 RNA (5S, tRNA 及降解的 RNA) 与正常的 mRNA、rRNA 共同洗脱下来, 可用 650 μ l 70% 乙醇代替 PM4 溶液。

若为了同时洗脱如 microRNA 和 siRNA 等小片段 RNA, 可把裂解物转移到一个可至少能容纳 2.6ml 的 Tube 中, 加入 650 μ l 100%乙醇。这部分 100% 乙醇需要自备。

这一步发生了什么: PM3 为绑定盐溶液, 可辅助提取总核酸, PM4 溶液为 100%乙醇。这些溶液为把 RNA、DNA 绑定到 Spin Filter 上创造化学条件。

10. 加载 650 μ l 上清到 Spin Filter 上, 13000g 离心 1min, 弃去滤液。重复步骤直至过滤完所有上清。

注意: 一般共需要加载三次上清。若为了提高 microRNA 和 siRNA 而额外添加了 100%乙醇, 可能共需要加载四次。

11. 使用前先摇匀 PM5。加入 650 μ l **PM5 溶液**, 13000g 离心 1min。

这一步发生了什么: PM5 为含异丙醇的冲洗缓冲液, 可去除滤膜上残留的盐溶液, 为 DNase 处理创造条件。

12. 弃去滤液, 13000g 再离心 1min, 以进一步去除残留的洗液。

13. 把 Spin Filter 放到一个干净的 2ml 收集管中 (试剂盒提供)。



ANBIOSCI TECH LTD

注意：若你想同时提取 RNA 和 DNA，请忽略步骤 14-16。

14. 加入 50 μ l DNase 溶液（每个提取需要混匀 45 μ l PM6 溶液和 5 μ l DNase I 稀释液，详见上文 DNase 溶液的制备）。

15. 室温孵育 15min。

这一步发生了什么：PM6 溶液为 DNase 消化缓冲液，DNase 浸润整个滤膜，消化其中的基因组 DNA。

16. 加入 400 μ l PM7 溶液，13000g 离心 1min。

这一步发生了什么：PM7 溶液可灭活 DNase，并把降解的 DNA 冲洗下来。

17. 弃去滤液，加入 650 μ l PM5 溶液，13000g 离心 1min。

18. 弃去滤液，加入 650 μ l PM4 溶液，13000g 离心 1min。

这一步发生了什么：PM5 和 PM4 为含异戊醇和酒精的冲洗缓冲液，洗脱 RNA 前分别出去离心柱上残留的盐分。

19. 弃去滤液，13000g 离心 2min，进一步去除残留的冲洗液。

这一步发生了什么：再一次离心确保滤膜上残留的乙醇全部去除，确保洗脱顺利进行。

20. 把 Spin Filter 放到一个干净的 2ml 收集管中（试剂盒提供）。

21. 把 100 μ l PM8 溶液（RNase-Free Water）加入到离心柱滤膜中间，常温放置至少 1min。

注意：使用 100 μ l PM8 可获得最大的 RNA 洗脱得率。为了获得更浓缩的 RNA，PM8 用量也不能少于 50 μ l。PM8 用量不能低于 50 μ l！

22. 13000g 离心 1min。

这一步发生了什么：RNA 从滤膜上洗脱下来，进入到 PM8（RNase-Free Water）中。此时 RNA 可直接用于下游酶实验。

23. 弃去 Spin Filter。

此时 RNA 可直接用于下游实验。装有 RNA 的 Tube 管可-80℃保存。

感谢选择使用 PowerMicrobiome™ RNA Isolation Kit!

疑点难点

RNA 降解

粪便样本最好的保存办法是-80℃冷冻保存，避免反复冻融。粪便固形物成分主要是含大量降解 RNA 的死亡的细菌，提取到完整 RNA 的同时抽提出大量小片段 RNA 是正常的。



ANBIOSCI TECH LTD

为了减少小片段降解 RNA，可步骤 9 中降低乙醇的浓度。用 650 μ l 70%乙醇代替 PM4.

若用 RNALater 保存粪便样本，请把加样量减少到 0.1g 以免堵塞离心柱。RNALater 的使用要求对最终提取得到的 RNA 做进一步基因组 DNA 消化处理（推荐使用货号 15200-50）。

裂解步骤中使用苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）pH6.7-8.0 可有助于保护 RNA 完整性。加样前加入 500 μ l 苯酚/氯仿/异戊醇到 Glass Bead Tube, 0.1mm 中。对于大多数固态样本，水相和有机相分离不明显，而含水量高的样品可能可以看到清洗的分成。总之，取上层溶液进入下一步处理。

纯度偏低

RNA 理想纯度 260/280 值应为 1.8-2.1, 260/230 值大于 1.5。若 RNA 纯度不够，有可能跟处理的样本类型有关。若 260/230 读数较低，可增加 PM2 的用量至 200 μ l 以去除更多抑制因子。如果增加 PM2 用量后，RNA 纯度仍不能让人满意，请减少加样量。

基因组 DNA 污染

根据样本中细菌数量情况，经过离心柱 DNase 消化后仍有可能残留少量基因组 DNA。为了完全去除基因组 DNA，可使用无需加热或 EDTA 干预 DNase Max™ Kit（货号：15200-50），以确保完全去除 DNA。

更多实用技巧请参阅 <http://www.anbiosci.com/MBweibo/blog.htm>