微生物 RNA 提取试剂盒（柱式法）使用说明书

【预期用途】

微生物 RNA 提取试剂盒（柱式法）用于从革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌或真菌等生物体中分离纯化出的总 RNA（含病毒和噬菌体 RNA）。

【检验原理】

在高速振荡情况下，玻璃珠破坏微生物细胞壁，细胞裂解液裂解细胞释放核酸，并与核酸保护剂一起保护 RNA 不被核酸酶水解。中和缓冲液清除 DNA，硅胶膜高效吸附 RNA，洗涤吸附柱，去除蛋白、盐等杂质。在洗脱液作用下，硅胶膜释放吸附的 RNA 从而获得高质量的 RNA。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	组成成分	50T	100T	200T
MDT-MR01N-1	消化液	2mL×1 支	4mL×1 瓶	8mL×1 瓶
	研磨管	50 支	100 支	200 支
	细胞裂解液 C	25mL×1 瓶	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶
	核酸保护剂	1mL×1 支	2mL×1 支	4mL×1 瓶
	中和缓冲液 R	7.5mL×1 瓶	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶
	RAW1 缓冲液	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	48mL×1 瓶
	吸附柱（含收集管）	50 支	100 支	200 支
	洗脱液 A	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶
	使用说明书	1 份	1 份	1 份

核酸保护剂和消化液：常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；
其他成分：常温（10-30℃）运输保存。有效期 1 年。

【注意事项】➢使用前务必认真阅读以下注意事项

1. 使用前，细胞裂解液 C 如有沉淀则 37℃以上孵育至液体澄清（孵育约 5-10 分钟）。
2. 使用前检查中和缓冲液 R 是否出现混浊或结晶，如有混浊或结晶，可于水浴中孵育至澄清。
3. 提前配制 RAW1，RAW1 中乙醇含量低于 60%会影响提取效果。
4. 提前配制 80%乙醇水溶液，乙醇水溶液中乙醇含量低于 80%会影响提取效果。
5. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
6. 虽然本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但操作时最好做好必要的防护措施，戴口罩手套，并且在通风的生物安全柜中进行。
7. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

新鲜的痰液、脓液、宫颈粘液、粪便、尿液、胸腹水、肺泡灌洗液、脑脊液、组织渗出液、各种拭子（宫颈刷）、培养物等。

【适用范围】

≦2.0×10^9 个细菌；≦5.0×10^7 个真菌。

【自备器械和试剂】

小型高速离心机（最大离心力≥12,000×g）、振荡仪（研钵、液氮）、1.5mL 离心管、生理盐水、无水乙醇和异丙醇等。

- **RAW1 配制：**RAW1 缓冲液使用前按照瓶身标签说明加入相应量的无水乙醇，使乙醇含量为 60%，混匀后密封常温保存。
- **80%乙醇水溶液配制：**1 份水加入 4 份无水乙醇，配制成 80%乙醇水溶液，混匀后密封常温保存。
- **消化缓冲液配制：**使用前每 1mL 生理盐水中加入 40μL 的消化液，配制成消化缓冲液。即用即配。
- 每次使用前检查**细胞裂解液 C** 和**中和缓冲液 R** 是否沉淀或结晶，如有沉淀或结晶，请于 37°C 以上孵育至液体澄清（孵育需要 5-10 分钟）。

【样本的处理】

1 痰液、脓液、宫颈粘液和粘液型粪便等样本

1.1 在痰液（脓液、宫颈粘液或粘液型粪便）中加入 5 倍体积的消化缓冲液，室温充分振荡，使粘液完全液化。

1.2 取一定量液化后的样本，12,000×g 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

1.3 在沉淀中加入 500μL 生理盐水，充分悬浮沉淀。12,000×g 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

➢用生理盐水洗涤 1 次沉淀能有效去除样本中的干扰物质，较好改善 260/280 以及 260/230 数据。

➢如果对 260/280 以及 260/230 的数据没有更高的要求可以省略该步骤直接进入步骤 1.4。

1.4 在沉淀中加入 20μL 核酸保护剂和 400μL 细胞裂解液 C，悬浮沉淀（**革兰氏阴性细菌混匀后室温放置 1 分钟**）。

1.5a 革兰氏阴性细菌：直接进入【**操作步骤**】。

1.5b 革兰氏阳性细菌及真菌：转移悬浮的沉淀至研磨管中，继续操作。

1.6 将研磨管放入振荡仪或研磨仪，振荡仪的程序为：室温（25℃）3,000rpm 振荡 10 分钟；研磨仪（以上海净信研磨仪为例）的程序为：运行 90 秒，中断 5 秒，运行 5 次，频率 70。

➢延长研磨管在振荡仪中的振荡时间可以提高 RNA 的得率。

➢研磨仪的程序需要根据微生物的种类和研磨仪的品牌不同而微调，如增加减少运行次数和频率等。

1.7 取出研磨管，瞬时离心。

2 粪便样本

2.1 在离心管中加入 20mg 粪便（黄豆大小）、20μL 核酸保护剂和 500μL 细胞裂解液 C，振荡混匀（**革兰氏阴性细菌混匀后室温放置 1 分钟**），瞬时离心。

2.2a 革兰氏阴性细菌：直接进入“**步骤 2.5**”。

2.2b 革兰氏阳性细菌及真菌：转移混匀的沉淀至研磨管中，继续操作。

2.3 将研磨管放入振荡仪或研磨仪，振荡仪的程序为：室温（25℃）3,000rpm 振荡 10 分钟；研磨仪（以上海净信研磨仪为例）的程序为：运行 90 秒，中断 5 秒，运行 5 次，频率 70。

➢延长研磨管在振荡仪中的振荡时间可以提高 RNA 的得率。

➢研磨仪的程序需要根据微生物的种类和研磨仪的品牌不同而微调，如增加减少运行次数和频率等。

2.4 取出研磨管，瞬时离心。

2.5 吸取 400μL 上清至新的 1.5mL 离心管中。

3 尿液、胸腹水、肺泡灌洗液、脑脊液、组织渗出液、水样粪便等样本

3.1 在 1.5mL 离心管中加入一定量的新鲜样本，12,000×g 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

3.2 在沉淀中加入 500μL 生理盐水，充分悬浮沉淀。12,000×g 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

3.3 在沉淀中加入 20μL 核酸保护剂和 400μL 细胞裂解液 C，悬浮沉淀（**革兰氏阴性细菌混匀后室温放置 1 分钟**）。

3.4a 革兰氏阴性细菌：直接进入【**操作步骤**】。

3.4b 革兰氏阳性细菌及真菌：转移悬浮的沉淀至研磨管中，继续操作。

3.5 将研磨管放入振荡仪或研磨仪，振荡仪的程序为：室温（25℃）3,000rpm 振荡 10 分钟；研磨仪（以上海净信研磨仪为例）的程序为：运行 90 秒，中断 5 秒，运行 5 次，频率 70。

➢延长研磨管在振荡仪中的振荡时间可以提高 RNA 的得率。

➢研磨仪的程序需要根据微生物的种类和研磨仪的品牌不同而微调，如增加减少运行次数和频率等。

3.6 取出研磨管，瞬时离心。

4 其他样本（研磨管研磨法）

4.1 各种拭子（宫颈刷）：将拭子（宫颈刷）在生理盐水中振荡 20 秒。取 1mL 振荡后的生理盐水加入至 1.5mL 离心管中，12,000×g 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

4.2 液体培养的细菌和真菌（酵母）样本：在 1.5mL 离心管中加入适量处于指数生长期的细菌（真菌）悬液（或者已计数的菌液），12,000×g 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

4.3 固体培养的细菌和真菌（酵母）样本：用接种环刮取一定量的细菌（真菌），加入含 1mL 生理盐水的 1.5mL 离心管中，充分混匀。12,000×g 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

4.4 在沉淀中加入 500μL 生理盐水，充分悬浮沉淀。12,000×g 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

➢用生理盐水洗涤 1 次沉淀能有效去除样本中的干扰物质，较好改善 260/280 以及 260/230 数据。

➢如果对 260/280 以及 260/230 的数据没有更高的要求可以省略该步骤直接进入步骤 4.5。

4.5 在沉淀中加入 20μL 核酸保护剂和 400μL 细胞裂解液 C，悬浮沉淀（**革兰氏阴性细菌混匀后室温放置 1 分钟**）。

4.6a 革兰氏阴性细菌：直接进入【**操作步骤**】。

4.6b 革兰氏阳性细菌及真菌：转移悬浮的沉淀至研磨管中，继续操作。

4.7 将研磨管放入振荡仪或研磨仪，振荡仪的程序为：室温（25℃）3,000rpm 振荡 10 分钟；研磨仪（以上海净信研磨仪为例）的程序为：运行 90 秒，中断 5 秒，运行 5 次，频率 70。

➢延长研磨管在振荡仪中的振荡时间可以提高 RNA 的得率。

➢研磨仪的程序需要根据微生物的种类和研磨仪的品牌不同而微调，如增加减少运行次数和频率等。

4.8 取出研磨管，瞬时离心。

5 其他样本（液氮研磨法）

5.1 按“**步骤 4.1-4.3**”收集一定量的革兰氏阳性细菌（真菌）沉淀。

5.2 在沉淀中加入 500μL 生理盐水，充分悬浮沉淀。12,000×g 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

➢用生理盐水洗涤 1 次沉淀能有效去除样本中的干扰物质，较好改善 260/280 以及 260/230 数据。

➢如果对 260/280 以及 260/230 的数据没有更高的要求可以省略该步骤直接进入“步骤 5.3”。

5.3 用 50μL 生理盐水悬浮细菌（真菌），转移至预冷的研钵中，加液氮磨成粉末。将粉末转移至 1.5mL 离心管中，将液氮充分挥发。

5.4 加入 20μL 核酸保护剂和 400μL 细胞裂解液 C，吹打混匀，室温放置 1 分钟。

【操作步骤】

1. 在上述含已处理样本的研磨管（离心管）中加入 150μL 中和缓冲液 R，吹打混匀。

2. 闭盖 12,000×g 离心 5 分钟。

3. 吸取 500μL 上清至 1.5mL 离心管中，加入 250μL 异丙醇，吹打混匀。将吸附柱放入收集管中，转移所有液体至吸附柱。

➢吸取上清时，尽量避免吸出沉淀。

➢用 250μL 无水乙醇替代 250μL 异丙醇也可以获得满意的提取效果。

4. 闭盖 12,000×g 离心 1 分钟。取出吸附柱，弃去废液，将吸附柱重新放入收集管中。

5. 开盖，在吸附柱中加入 600μL RAW1，闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去废液，将吸附柱重新放入收集管中。

➢加入 RAW1 时，避免 RAW1 接触吸附柱的管口。

6. 开盖，在吸附柱中加入 600μL 80%乙醇水溶液，闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去废液，将吸附柱重新放入收集管中。

7. 开盖，在吸附柱中加入 600μL 80%乙醇水溶液，闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，丢弃收集管。

8. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，闭盖 12,000×g 离心 3 分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。

9. 将吸附柱转入新的 1.5mL 离心管中，加入 50μL 洗脱液 A 至吸附柱中心。闭盖室温静置 1 分钟，12,000×g 离心 1 分钟，收集洗脱液，备用。

➢洗脱液 A 的使用量可以根据需要调整，但用量不得低于 30μL。

➢洗脱液 A 的使用量太少会影响提取效果。

【微生物 RNA 提取（柱式法）常见问题】

RNA 提取常见问题	原因	解决方案
吸附柱堵塞	1.样本使用量过多	减少样本使用量，使用量不超过 2.0×10^9 个细菌和 5.0×10^7 个真菌。
未提取到 RNA 或产量低	1.样本使用量过少	增加样本使用量，但使用量不超过 2.0×10^9 个细菌和 5.0×10^7 个真菌。
	2.样本未及时保存或保存不当	样本保存温度不当或保存时间过长，内源性 RNase 导致 RNA 降解。采用新鲜、液氮保存或保存液保存的样本。
	3.细胞壁破坏不充分	研磨时细胞壁破坏不充分，增加研磨速度和时间。
	4.细胞裂解液和中和缓冲液使用不当	细菌裂解液和中和缓冲液在温度较低时可能出现浑浊或结晶，应置于 37℃以上孵育直至完全溶解；按说明书正确加入细胞裂解液和中和缓冲液。
	5.异丙醇使用量过少或过多	按说明书准确加入异丙醇。
	6. RAW1 中乙醇添加比例不当	使用无水乙醇配制 RAW1，使乙醇含量达 60%。
	7. 80%乙醇水溶液配制不当	使用无水乙醇配制 80%乙醇水溶液，乙醇含量达 80%。
	8.洗脱不当	洗脱液加至膜中央，适当减少洗脱体积，可 65°C 预热、延长室温放置时间或者进行二次洗脱。
RNA 降解	1.样本未及时保存或保存不当	采用新鲜、液氮保存或组织保存液（RNA Later）保存的样本。
	2.样本反复冻融	避免样本反复冻融，分装保存。
	3.电泳污染和环境污染	电泳前确保电泳槽、制胶板和电泳液无 RNase 污染，如有污染：①使用洗洁精充分清洗电泳槽和制胶板，再用 3%双氧水浸泡 20 min，然后用 RNase-free ddH_2O 进行冲洗；②或使用本公司的核酸酶清除剂（MDT-NSS）清除 RNase；使用 RNase-free ddH_2O 配制电泳缓冲液。 2.使用相对新鲜（2-8°C密闭保存不超过 3 天）的琼脂糖凝胶进行电泳。 3. 配制琼脂糖凝胶时，凝胶室温凝固时间在 30-60 分钟之间。
纯度低	1.盐离子残留	加入 RAW1 后闭盖静置 30 秒；避免 RAW1 接触吸附柱上下口；使用 80%乙醇水溶液再洗涤 1 次。
	2.乙醇残留	最后一次洗涤后，吸附柱闭盖 12,000×g 再离心 3 分钟。
gDNA 污染	1.样本使用量过高	不同样本 DNA 含量相差大，减少样本使用量，使用量不超过 2.0×10^9 个细菌和 5.0×10^7 个真菌。
	2.裂解液和中和缓冲液使用不当	按说明书正确加入裂解液和中和缓冲液。

【说明书编制日期】2024 年 01 月 25 日

【基本信息】

企业名称：无锡迈德泰克生物医药有限公司
公司地址：江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道 1699 号生命科技产业园 C5 楼 C50206 室
网　　址：www.wuxi-medtech.com
联系电话：173 1562 0564（微信同号）；　138 6175 7779（微信同号）