



武汉科尔普生物科技有限公司

Keep Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ EASYspin 酵母RNA快速提取试剂盒
- ◆ 目录号 RN10
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次
缓冲液 SE	室温	15 ml
Lytic Enzyme	-20°C	2.5 ml
裂解液 RLT	室温	20 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
RNase-free H ₂ O	室温	5 ml
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

本试剂盒按照指示储存 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°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温（4°C 或者 -20°C）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°C—25°C）进行。
3. **Lytic Enzyme 为蜗牛酶甘油储液，因此比较粘稠，请小心取用，-20°C 保存。** 蜗牛酶是从蜗牛的嗦囊和消化道中制备的混合酶，它含有纤维素酶，果胶酶，淀粉酶，蛋白酶等 20 多种酶。适合破碎溶解各种酵母的细胞壁。
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:

酵母细胞经 lytic Enzyme 处理去除细胞壁后,独特的裂解液/ β -巯基乙醇迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶,然后用乙醇调节结合条件后,RNA 选择性吸附于离心柱内硅基质膜,再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤,去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物,蛋白等杂质去除,最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ 产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜,柱与柱之间吸附量差异极小,可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚,氯仿等试剂,也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速,简捷,单个样品操作一般可在 20 分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.9~2.0,基本无 DNA 残留,可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

❖ 注意事项

1. 第一次使用前请先在漂洗液 RW 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！
2. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
3. 需要自备乙醇， β -巯基乙醇，水浴锅。
4. 裂解液 RLT 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**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：

一般情况下，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，本公司的 EASYspin 系列 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留（一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见）影响不是很大，如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR，我们建议在进行模板和引物的选择时：

- 1) 选用跨内含子的引物，以穿过 mRNA 中的连接区，这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
- 2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
- 3) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(cleanup)，请联系我们索取具体操作说明书。
- 4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。请联系我们索取具体操作说明书。

6. RNA 纯度及浓度检测:

完整性: RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件: 胶浓度 1.2%; 0.5×TBE 电泳缓冲液; 150v, 15 分钟)检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA, 电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。动物 rRNA 大小分别约为 5 kb 和 2kb, 分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍, 否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度: OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA, OD260/OD280 读数 (10mM Tris, pH7.5) 在 1.9-2.2 之间。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品, 假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280 读数 1.8-2.1 之间, 在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间, 但这并不表示 RNA 不纯。

浓度: 取一定量的 RNA 提取物, 用 RNase-free 水稀释 n 倍, 用 RNase-free 水将分光光度计调零, 取稀释液进行 OD260, OD280 测定, 按照以下公式进行 RNA 浓度的计算: 终浓度 (ng/μl) = (OD260)×(稀释倍数 n)×40

❖ 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漂洗液 RW 瓶中加入指定量无水乙醇！
- ⇒ 操作前在裂解液 RLT 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml RLT 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT 4℃可放置一个月。
- ⇒ 吸取使用量的缓冲液 SE 加入 0.2% β -巯基乙醇备用。

1. 少量酵母培养细胞

- a. 收集 1ml（约 10^7 细胞）处于**对数生长期**酵母培养物到 1.5ml 离心管，12,000 rpm 离心 30 秒，尽可能吸弃上清。
- b. 加入 100 μ l 缓冲液 SE 中（确认已经加入 **β -巯基乙醇至终浓度 0.2%**），轻柔吹打充分重悬细胞；根据酵母量加入约 20 μ l Lytic Enzyme 储液，充分颠倒混匀，37℃温育 15—30 分钟消化细胞壁，中间可颠倒数次帮助消化。

如果破壁效果不好导致产量低，可以加大 lytic Enzyme 用量来提高酶工作浓度，还可以延长消化时间或者提高温度到 45℃来提高效果，不适合 Lytic Enzyme 消化的酵母可选用其它方法如 0.5mm 玻璃珠涡旋击打，反复冻融等。

- c. 加入 380 μ l 裂解液 RLT（确认已经加入 **β -巯基乙醇至终浓度 1%**），吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。

一般加入裂解液后充分涡旋吹打后应该见不到明显团块或者不溶物，极少数情况下如果有明显团块或者不溶物可以将裂解物 13,000rpm 离心 3 分钟，沉淀不能裂解的碎片或者不溶物，将裂解物上清全部转到一个新离心管再进行下一步。

- d. 加入 280 μ l 96—100%乙醇，立即吹打混匀，不要离心。
- e. 接**操作步骤**项下 3。

2. 中量酵母培养细胞

a. 收集 2—3ml (约 3×10^7 细胞)处于**对数生长期**酵母培养物到 1.5ml 离心管(超过 1.5ml 可分两次在同一个离心管内进行收集细胞), 12, 000rpm 离心 30 秒, 尽可能吸弃上清。

b. 加入 300 μ l 缓冲液 SE 中 (确认已经加入 **β -巯基乙醇至终浓度 0.2%**), 轻柔吹打充分重悬细胞; 根据酵母量加入 50 μ l Lytic Enzyme 储液, 充分颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 15—30 分钟消化细胞壁, 中间可颠倒数次帮助消化。

如果破壁效果不好导致产量低, 可以加大 lytic Enzyme 用量来提高酶工作浓度, 还可以延长消化时间或者提高温度到 45 $^{\circ}$ C 来提高效果, 不适合 Lytic Enzyme 消化的酵母可选用其它方法如 0.5mm 玻璃珠涡旋击打, 反复冻融等。

c. 13,000 rpm 离心 1 分钟, 尽可能吸弃上清。

d. 加入 350 μ l 裂解液 RLT (确认已经加入 **β -巯基乙醇至终浓度 1%**), 吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。

一般加入裂解液后充分涡旋吹打后应该见不到明显团块或者不溶物, 极少数情况下如果有明显团块或者不溶物可以将裂解物 13, 000rpm 离心 3 分钟, 沉淀不能裂解的碎片或者不溶物, 将裂解物上清全部转到一个新离心管再进行下一步。

e. 加入等体积 70% 乙醇 (DEPC 水配制, 约 350 μ l) 立即吹打混匀, 不要离心。

f. 接**操作步骤**项下 3。

3. 将混合物加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 30-60 秒, 弃掉废液。

4. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 秒, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。

如果 DNA 残留明显, 可在加入 RW1 后室温放置 5 分钟再离心。

-
5. 加入 500 μ l 漂洗液 RW(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 漂洗液 RW,重复一遍。
6. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000 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 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 μ l RNase free water (事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量), 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。
8. 如果预期 RNA 产量>30 μ g,加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 7, 合并两次洗脱液,或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。
洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高,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,用户根据需要选择。