
版本号:260117

EASYspin Yeast RNA Kit
EASYspin 酵母 RNA 快速提取试剂盒

目录号: RN10

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次(RN1001)
缓冲液 SE	室温	15 ml
裂解液 RLT	室温	20 ml
去蛋白液 RW1	室温	35 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	5 ml
Lytic Enzyme	-20°C	2.5 ml
RNA 吸附柱 和收集管	室温	50 套

本试剂盒按照指示温度储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 试剂盒全部组分可以常温运输, 收到后室温保存 (低温组分置-20°C保存)。
2. 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。蜗牛酶是从蜗牛的腺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。
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。

❖ 产品介绍:

本制品经 lytic Enzyme 处理去除酵母细胞壁配合独特的裂解液，不需要苯酚/氯仿。适用于从多种酵母中高效提取高纯度、高质量的总 RNA。得到的总 RNA 纯度高，gDNA 残留少，无蛋白和其他杂质污染，可用于 RT-PCR、RT-qPCR、RNA 高通量测序建库、芯片分析等多种下游实验。

❖ 产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，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. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 20 分钟内完成。
3. RNA 完整性极好不降解，电泳图 28S:18S 典型比值大于 2:1。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 2.1-2.2 (100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右，很多公司的产品因为残留蛋白或 DNA 较多，造成比值降低，无法达到 2.2 这个纯度标准，因此降低要求 1.9-2.0 就凑合使用了，但是艾德莱的产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准)。
5. 最后空甩离心步骤能彻底去除乙醇残留，离心后可以直洗脱，不用增加开盖/晾干乙醇/关盖等繁琐步骤。

❖ 注意事项

1. **所有离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到 13,000 rpm 的离心机。
2. 自备乙醇，Beta 巯基乙醇、水浴锅。
3. 裂解液 RLT 和去蛋白液 RW1 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。**
4. 本试剂盒可去除体系中绝大部分的 DNA 污染，纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase I 处理即可用于下游实验操作。如果下游实验对痕量 DNA 十分敏感，可以使用 DNase I 进一步清除 DNA 污染 (艾德莱货号: RN45)。以后提取时购买 DNA 酶柱上消化试剂盒在提取中去除 DNA (艾德莱货号: RN34) 前可先索取具体操作说明书。

❖ 操作步骤

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶按照标签说明加入无水乙醇!
- ⇒ 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°C 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, 13, 000 rpm 离心 30 sec, 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°C 温育 15-30 min 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°C 来提高效果。

▲ 一般常见酵母毕赤酵母、酿酒酵母等等都有良好效果, 如果 Lytic Enzyme 消化效果差的酵母种类可选用其它方法如 0.5 mm 玻璃珠涡旋击打, 反复冻融等。包括可以使用酵母溶壁酶 (Lyticase) 处理提高效果。

- 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%**), 吹打混匀后剧烈振荡 20 sec, 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, 000 rpm 离心 3 min, 沉淀不能裂解的碎片或不溶物, 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 无水乙醇, 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 2-3 ml (约 3×10^7 细胞) 处于**对数生长期**酵母培养物到 1.5 ml 离心管 (超过 1.5 ml 可分两次在同一个离心管内进行收集细胞), 13, 000 rpm 离心 30 sec, 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°C 温育 15-30 min 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°C 来提高效果。

▲ 一般常见酵母毕赤酵母、酿酒酵母等等都有良好效果，如果 Lytic Enzyme 消化效果差的酵母种类可选用其它方法如 0.5 mm 玻璃珠涡旋击打，反复冻融等。包括可以使用酵母溶壁酶（Lyticase）处理提高效果。

c. 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%**），吹打混匀后剧烈振荡 20 sec，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. 加入等体积 70%乙醇（DEPC 水配制，约 350 μ l）立即吹打混匀，不要离心。

▲ 如手头没有 70%乙醇也可以加入 0.5 倍体积无水乙醇（约 200 μ l）。

e. 接操作步骤项下 3。

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

4. 向通用柱中加入 700 μ l 去蛋白液 RW1，室温放置 1 min，13,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。

5. 向通用柱中加入 500 μ l 漂洗液 RW（使用前请检查是否已加入无水乙醇），13,000 rpm 离心 15 sec，弃滤液。

6. 重复步骤 7 一遍。

7. 将通用柱放回收集管中，13,000 rpm 离心 2 min。

▲ 空甩作用是尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

8. 将通用柱转移至新的 1.5 ml 离心管中，向吸附柱膜中央悬空滴加 30-50 μ l 的 RNase-free ddH₂O，静置 1 min，13,000 rpm 离心 1 min。

▲ 洗脱体积建议不少于 30 μ l，体积过小会影响核酸回收效率。

▲ 以下步骤都可以帮助提高 RNA 产物浓度：

RNase-free ddH₂O 于 90°C 预热；

将第一次洗脱液重新加入吸附柱进行洗脱，两次洗脱可以提高浓度约 10%。

9. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或 -85°C ~ -65°C 保存。