

# AipEasy 酵母 RNA 快速提取试剂盒,带裂壁酶(离心柱型)

AipEasy Yeast RNA Rapid Extraction Kit, With Lytic Enzyme(Centrifugal Column)

## 使用说明书

◆目录号：RE262

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次 (RE262-01)
缓冲液 SE	室温	30mL
Lytic Enzyme	-20°C	2.5mL
裂解液 RLT	室温	20mL
去蛋白液 RW1	室温	40mL
漂洗液 RW	室温	10mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	50 套

◆储存条件：本试剂盒按照指示储存 12 个月不影响使用效果。

◆储存注意事项：

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 Water 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，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 典型的比值达 1.9~2.0，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 等各种实验。

#### ◆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 13,000rpm 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(Clean up)，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 5kb 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**  $OD_{260}/OD_{280}$  比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA,  $OD_{260}/OD_{280}$  读数(10mM Tris, pH7.5)在 1.9-2.2 之间。 $OD_{260}/OD_{280}$  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  $OD_{260}/OD_{280}$  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  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  测定, 按照以下公式进行 RNA 浓度的计算: 终浓度( $ng/\mu L$ )=( $OD_{260}$ )×(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  $\beta$ -巯基乙醇至终浓度 1%, 如 1mL RLT 中加入 10 $\mu$ L  $\beta$ -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% $\beta$ -巯基乙醇备用。

#### 1. 小量酵母培养细胞

- 1) 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, 12,000rpm 离心 30 秒, 尽可能吸弃上清。
- 2) 加入 100 $\mu$ L 缓冲液 SE 中(确认已经加入  $\beta$ -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 $\mu$ 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。

**注:** 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。

- 3) 加入 380 $\mu$ L 裂解液 RLT(确认已经加入  $\beta$ -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。

**注:** 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。

4) 加入 280μL 96—100%乙醇，立即吹打混匀，不要离心。

5) 接操作步骤项下 3。

## 2. 中量酵母培养细胞

1) 收集 2—3mL(约  $3 \times 10^7$  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。

2) 加入 300μL 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 50μL Lytic Enzyme 储液，充分颠倒混匀，37°C 温育 15—30 分钟消化细胞壁，中间可颠倒数次帮助消化。

**注：**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，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。

3) 13,000rpm 离心 1 分钟，尽可能吸弃上清。

4) 加入 350μL 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。

**注：**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。

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

6) 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)13,000rpm 离心 30-60 秒，弃掉废液。

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

**注：**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 500μL 漂洗液 RW(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 500μL 漂洗液 RW，重复一遍。

6. 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。

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 $\mu$ L RNase-free Water(事先在 70-90°C水浴中加热可提高产量)，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。

8. 如果预期 RNA 产量>30 $\mu$ g，加 30-50 $\mu$ 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)。

**注** 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，用户根据需要进行选择。

=====

