

酵母 RNA 小提试剂盒简明说明书 (R6617)

产品简介

本试剂盒提供一种简便、快速的方法，可在 30 分钟内从酵母中分离总 RNA。结合 ezBind RNA 技术的可逆结合特性，并配有专门设计的缓冲液系统，可在 RNA 分离前有效去除 DNA。裂解液通过 DNA Clearance Column，去除基因组 DNA。必要时，使用 DNase I（详见操作步骤）可消除微量的基因组 DNA。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
Buffer LY	6 mL	28 mL	135 mL
Buffer RB	6 mL	30 mL	135 mL
RNA Wash Buffer	3 mL	24 mL	3x24 mL
DEPC-Treated ddH ₂ O	1.2 mL	10 mL	30 mL
DNA Clearance Columns	10	50	250
RNA Columns	10	50	250
2 mL Collection Tubes	20	100	500
1.5 mL RNase-free Microfuge Tubes	10	50	250
Lyticase solution	31 U	155 U	775 U
User Manual	1	1	1

要点

- RNA Wash Buffer：使用前请将 12 mL (R6617-00)或 96 mL (R6617-01)或 96 mL (R6617-02) 96-100%乙醇加入至每个 RNA Wash Buffer 瓶内。

- Buffer LY：使用前在 Buffer LY 内加入 1%的β-巯基乙醇，并储存于 4°C。
- 按下表准备 Lyticase solution：100 U/mL，分装至小管并储存于 -20°C，使用前解冻。每个样品需要 30 μL 的 Lyticase solution。

R6617-00	加入 310 μL Elution Buffer 至 Lyticase solution
R6617-01	加入 1.6 mL Elution Buffer 至 Lyticase solution
R6617-02	加入 8 mL Elution Buffer 至 Lyticase solution

- 所有操作（包括离心）均在室温下进行。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。所有试剂及用品可保存于室温（4-28°C）。

实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- 小型台式离心机
- 自备溶液：1 M 山梨糖醇，0.1 M EDTA (pH7.4)。

操作步骤

1. 在 3 mL 选择性培养基中，合适的温度下，过夜培养细菌，使之 OD₆₀₀ >1，转移至 1.5 mL 离心管内，12,000 rpm 离心 2 min 收集菌体。
2. 加入 100 μL 以下溶液重悬菌体：
溶液：含 1 M 山梨糖醇和 0.1 M EDTA (pH7.4)

注：使用前，加入终浓度 0.1%的 β-巯基乙醇和 30 μL Lyticase solution。
3. 30°C 孵育 15~30 min，直至溶液澄清。

4. 加入 **500 μL Buffer LY**，混匀。
5. 转移澄清的裂解液至一个 **DNA Clearance Column**（自带 **2 mL Collection Tube**），13,000 rpm 离心 2 min，丢弃 **DNA Clearance Column**，保留滤液。

注：该步骤用于去除基因组 DNA。

6. 加入 0.5 倍体积的 100%乙醇（例如：250 μL 100%乙醇加入至 500 μL 裂解液中）。

7. 将上述混合液转移至一个 **RNA Column** 中，12,000 rpm 离心 1 min，丢弃 **2 mL Collection Tube** 及滤液，将 **RNA Column** 置于一个新的 **2 mL Collection Tube** 中。

8. 加入 **500 μL Buffer RB**，12,000 rpm 离心 30 s，弃滤液。

9. 加入 **500 μL RNA Wash Buffer**，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

注：确保使用前在 **RNA Wash Buffer** 中按说要求加入一定量的乙醇。

10. 加入 **500 μL RNA Wash Buffer**，12,000 rpm 离心 30 s，弃滤液。

11. 将 **RNA Column** 盖子打开，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

注：这一步对于残留的乙醇去除非常重要。

12. 将 **RNA Column** 转移至一个 **1.5 mL RNase-free Microfuge Tube**，在膜中央加入 **50~100 μL DEPC-Treated ddH₂O**，13,000 rpm 离心 2 min。RNA 存在于滤液中，将 RNA 溶液储存在 -20°C。

注：强烈建议在开始下游实验前确定 RNA 的质量，RNA 的质量可通过溴化乙锭染色变性琼脂糖凝胶电泳测定。凝胶上应该出现几条清晰的条

带，包括 28 S 和 18 S 核糖体 RNA 条带，以及一定的 mRNA 条带。若这些条带向较低分子量的 RNA 弥散，那么 RNA 在制备、处理或储存过程中发生了很大降解，低于 200 个碱基的 RNA 分子不能有效地结合 RNA Column。A₂₆₀/A₂₈₀ 的值在 1.8~2.0 相当于 90~100% 的纯核酸。

可选步骤：使用 DNase 消化去除基因组 DNA

一些下游实验例如低丰度的靶基因 RT-PCR，对少量的 DNA 非常敏感，需要用到 DNase 消化。通常来说，不需要这样做，因为本试剂盒已选择性提取 RNA 并去除了绝大部分 DNA。若存在 DNA 污染，要么减少组织或细胞的使用量。

Catalog#	D001-00	D001-01	D001-02
Preps	10	50	250
DNase I*			
1 x DNase I Buffer*			
DNase Stop Buffer*			

*DNase I 可向 BEIWO 单独购买。

操作步骤（DNase 消化去除基因组 DNA）

1. 将样品转移至 RNA Column 后，按下面操作进行 DNase I 消化。
2. 将 RNA Column 置于 2 mL Collection Tube，加入 **500 μL Buffer RB**，按先前的操作步骤离心并弃上清，重复使用收集管。
3. 加入 **50 μL DNase I** 至 RNA Column 膜中央，室温静置 15 min。加入 **200 μL DNase Stop Buffer**，13,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。加入 **300 μL RNA Wash Buffer**，13,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

常见问题解答

问题	可能原因	建议
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比值低	蛋白污染	使用苯酚：氯仿萃取，RNA 损失预计在 40% 以内。
	硫氰酸胍污染	加入 2.5 倍体积的乙醇和 0.1 M 的 NaCl（终浓度）来沉降 RNA，-20℃ 孵育 30 min，4℃，10,000 x g 离心 15 min，用 DEPC-Treated ddH ₂ O 重悬 RNA 沉淀。
低得率	样品中 RNA 已降解	采集样品后快速液氮冷冻并储存于 -70℃。
	样品加载量超过了 RNA 柱的最大吸附能力	减少组织样品的加入量。
	乙醇没有加入至 RNA Wash Buffer 中	纯化前在 RNA Wash Buffer 内按要求加入一定量的乙醇。
基因组 DNA 污染	RT-PCR 加入过量 RNA	减少 RT-PCR 反应时 RNA 的加入量，控制在 50~100 ng。
	样品富含 DNA	减少样品初始使用量，30 mg 左右的样品初始使用量大多会出现基因组污染的情况。减少细胞数目至 1~2 x 10 ⁶ ，增加 buffer 的使用量，分批次多上几次 RNA 柱子。

杭州倍沃医学科技有限公司

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

market@beiwobiomedical.com