

## 真菌 RNA 小提试剂盒简明说明书 (R6618)

### 产品简介

本试剂盒提供一种简便、快速的方法，可从多种真菌样品中分离总 RNA。本试剂盒不需要使用笨重或昂贵的粉碎/均质化组件来剪切粘性真菌裂解液。相反地，该方法包括一个简单而快速的沉淀步骤，用来去除真菌组织中常见的多糖和酚类化合物。结合 RNA Column，该方法可从多达 200 mg 的组织中纯化高质量的 RNA，亦可从 10 mg 组织或 100 个细胞中提取总 RNA。典型的得率可见表 1。提取过程不涉及有机提取，因此减少了塑料废弃物和动手操作的时间。本试剂盒是在 1 小时内并行处理多个真菌样品的理想工具。纯化的 RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的比值在 1.8-2.0，可用于 RT-PCR，Northern 分析，差异显示和 poly A<sup>+</sup> RNA 提取。

本试剂盒结合了 EZBind RNA 的可逆吸附特性和独特的缓冲液系统，可在 RNA 纯化前有效去除 DNA。裂解液可通过 DNA Clearance Column 去除基因组 DNA。必要时，DNase I 消化可消除微量基因组 DNA（详见操作步骤）。

### 注意事项

每个 RNA Column 可吸附至多 100 μg RNA。若使用超过 250 mg 的真菌组织，并不能显著提高 RNA 产量，甚至可能产生不良结果。

### 产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
Buffer FLY	6 mL	30 mL	135 mL
Buffer RB	6 mL	30 mL	135 mL
RNA Wash Buffer	3 mL	24 mL	3 x 24 mL
DEPC-Treated ddH <sub>2</sub> 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
User Manual	1	1	1

### 要点

- **RNA Wash Buffer:** 使用前请将 12 mL (R6618-00) 或 96 mL (R6618-01) 或 96 mL (R6618-02) 96-100%乙醇加入至每个 RNA Wash Buffer 瓶内。
- **Buffer FLY:** 使用前在每 1 mL Buffer FLY 内加入 20 μL 的β-巯基乙醇（室温可存放一周）。
- 操作时请佩戴乳胶手套，经常更换手套以减少 RNase 污染。使用试剂时，仅使用无 RNase 的一次性枪头。尽量仔细又快速地完成操作。
- 请在室温下（15-25°C）进行所有离心步骤。

### 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

- 小型台式离心机，可达到 10,000 ×g 转速
- 无 RNase 的离心管（1.5 mL，2 mL）
- β-巯基乙醇
- 96-100%乙醇
- 液氮（用于冻结/破坏样品）
- 65°C 预热分装成 100 μL/管的 DEPC-Treated ddH<sub>2</sub>O

### 操作步骤

此操作步骤适用于大多数新鲜或冷冻组织样本，可有效回收 RNA。然而，由于真菌样品中水分和多糖含量的巨大变化，样品量应控制在 100 mg 以内。使用本方法，成功地纯化得到足量的 RNA 用于 Northern 分析。戴上一次性手套，将组织收集在 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管内，用镊子将离心管浸没于液氮中。用一次性匀浆棒或同等工具研磨组织。亦可让液氮蒸发，然后将样品储存于 -70°C 以备以后使用。不要让样品解冻。一次性研杵棒仅可使用一次，亦可使用小型干净的研钵和研杵。上述破坏真菌组织的方法不能用机械匀浆器替代。

1. 称量 30-100 mg 真菌组织于一个 2 mL 管内，置于液氮中冷冻，用转子启动器研磨。
2. 加入 **500 μL Buffer FLY/β-巯基乙醇**。用力涡旋，以确保所有团块被打散，聚团样品不能有效提取 RNA。

**注：**建议样品初始使用量为 50 mg，若结果较为满意的话，可适当增加样品初始使用量（不超过 100 mg）。每 1 mL Buffer FLY 中加入 20 μL 的β-巯基乙醇，在样品解冻前加入。

3. 将澄清的裂解液转移至一个 **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：**此步骤用于去除基因组 DNA。

4. 加入 0.5 倍体积的 96-100%乙醇，涡旋混匀。

5. 转移上述混合液至一个 RNA Column（自带 2 mL Collection Tube），轻轻地扣上盖子。10,000 ×g 离心 30 s，丢弃滤液，将 RNA Column 放回 2 mL Collection Tube。

**可选：**柱上 DNase I 消化（见操作步骤后可选步骤）

6. 加入 500 μL Buffer RB，轻轻盖上盖子。10,000 ×g 离心 30 s，弃滤液和 2 mL Collection Tube。

7. 将 RNA Column 置于一个新的 2 mL Collection Tube，加入 500 μL RNA Wash Buffer，轻轻合上盖子，10,000 ×g 离心 30 s，弃滤液。

8. 加入 500 μL RNA Wash Buffer，重复步骤 7。离心并弃滤液，空离 1 min，干燥柱子。

9. 洗脱 RNA。转移 RNA Column 至一个 1.5 mL RNase-free Microfuge Tube，加入 50-100 μL DEPC-Treated ddH<sub>2</sub>O，确保加入至柱子膜中央。最大转速离心 1 min。二次洗脱有助于提高 RNA 得率至 50 μg 以上。

**注：**加大洗脱体积可增加 RNA 得率，但浓度会降低，由于 80%的 RNA 在第一次洗脱时已经回收得到。

**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。A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 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。DNase I 可向 BEIWO 单独购买（Catalog# D001）。

#### 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。
4. 然后根据前述步骤 6 继续实验。

### 常见问题解答

问题	可能原因	建议
洗脱到的 RNA 很少或没有	RNA 残留在 RNA Column 上	再次洗脱；将 DEPC-Treated ddH <sub>2</sub> O 预热至 70°C，静置 10 min 后离心洗脱。
	柱子过载	减少初始样品使用量。
柱子堵塞	真菌组织不完全破坏或	使用液氮完全破坏组织，增加离心时间，减少样品初始使用量。

	裂解不彻底	
RNA 沉淀没有溶解	核酸和多糖成分多	减少样品初始使用量（50-100 mg 为佳），为了避免 RNA 降解，使用 Buffer FLY 溶解 RNA 沉淀。
RNA 降解	样品来源	将新鲜样品快速冻存于液氮中，保存于 -70°C，中途不要解冻。按照操作步骤进行 RNA 提取，快速操作，确保 β-巯基乙醇添加至 Buffer FLY 内。
	RNase 污染	操作过程中尽量减少 RNase 污染，检查 buffer 是否污染了 RNase。
下游实验存在问题	洗脱时存在盐离子污染	确保 RNA Wash Buffer 在使用前加入了正确量的无水乙醇，然后室温储存。用 RNA Wash Buffer 再次洗涤 RNA 沉淀。
基因组污染	DNA 被提取出来了	使用无 RNase 的 DNase 在 75°C 消化 5 min。
Abs 比值低	RNA 被酸性缓冲液或水稀释了	DEPC-Treated ddH <sub>2</sub> O 是酸性的，会降低 Abs <sub>260</sub> 的值，检测前使用 TE Buffer（pH8）来稀释 RNA。

杭州倍沃医学科技有限公司

[www.beiwobiomedical.com](http://www.beiwobiomedical.com)

400-115-2855

[market@beiwobiomedical.com](mailto:market@beiwobiomedical.com)