****

**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A260/A280的比值在1.8-2.0，可用于RT-PCR，Northern分析，差异显示和poly A+ 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 | 4 | 50 | 250 |
| Buffer FLY | 3mL | 30 mL | 135 mL |
| Buffer RB | 3 mL | 30 mL | 135 mL |
| RNA Wash Buffer | 2 mL | 24 mL | 3 x 24 mL |
| DEPC-Treated ddH2O | 0.5mL | 10 mL | 30 mL |
| DNA Clearance Columns | 4 | 50 | 250 |
| RNA Columns | 4 | 50 | 250 |
| 2 mL Collection Tubes | 8 | 100 | 500 |
| 1.5 mL RNase-free Microfuge Tubes | 4 | 50 | 250 |
| User Manual | 1 | 1 | 1 |

**要点**

* RNA Wash Buffer：使用前请将8 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℃）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℃）。

**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℃预热分装成100 μL/管的DEPC-Treated ddH2O

**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℃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。

1. 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。

1. 加入0.5倍体积的96-100%乙醇，涡旋混匀。
2. 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）

1. 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**。
2. 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。
3. 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。
4. 洗脱RNA。转移**RNA Column**至一个**1.5 mL RNase-free Microfuge Tube**，加入**50-100 μL DEPC-Treated ddH2O**，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。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。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 ddH2O预热至70℃，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裂解不彻底 | 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。 |
| 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℃，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℃消化5 min。 |
| Abs比值低 | RNA被酸性缓冲液或水稀释了 | DEPC-Treated ddH2O是酸性的，会降低Abs260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.biomiga.com.cn/)

**400-115-2855**

[market@beiwobiomedical.com](mailto:sales@biomiga.com.cn)