



## 真菌 RNA 小量提取试剂盒说明书 (BW-R6618)

Ver: 202512

### 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	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 ddH <sub>2</sub> O	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%乙醇加入至每一个 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**。 $A_{260}/A_{280}$  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。

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 Abs260 的值, 检测前使用 TE Buffer (pH8) 来稀释 RNA。

## 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 <b>RNA Column</b> 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。

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA (中国)

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

400-115-2855

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

