

M5 EASYspin 酵母 RNA 快速提取试剂盒 (带 Lytic Enzyme) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 EASYspin 酵母 RNA 快速提取试剂盒	50T	MF158-01

【储存条件】

本试剂盒按照指示储存 12 个月不影响使用效果。

1. 所有溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不能直接使用，需在 37℃ 水浴加热几分钟，恢复澄清后使用。
2. 不合适的储存于低温（4℃ 或者 -20℃）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℃ - 25℃）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℃ 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。

【产品简介】

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 H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

【产品特色】

1. 离心吸附柱内硅基质膜采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
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，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.9~2.0，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

【产品组份】

	50T	注意事项
缓冲液 SE	30 ml	室温密闭干燥保存
Lytic Enzyme	2.5 ml	-20℃ 保存
裂解液 RLT	20 ml	室温密闭干燥保存
去蛋白液 RW1	40 ml	室温密闭干燥保存
漂洗液 RW	10ml	初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇
RNase-Free H ₂ O	10ml	室温密闭干燥保存
RNase-Free 吸附套管(RA)	50 套	室温密闭干燥保存

【注意事项】

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 需要自备 β-巯基乙醇、乙醇（尽量新开封或者 RNA 专用），水浴锅。
3. 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。
4. 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！
5. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：
 - 1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染。
 - 2) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - 3) RNA 在裂解液 RLT 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150℃ 烘烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。
 - 4) 配制溶液应使用无 RNase 的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.1% (v/v)，37℃ 放置过夜，高压灭菌。）

6. 关于 DNA 的微量残留:

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, 本产品采取了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, 我们建议在进行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(cleanup), 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。

【操作步骤】

<实验前请先阅读注意事项, 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量的无水乙醇!>

- 实验前准备:** 1) 操作前在裂解液 RLT 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%, 如 1 ml RLT 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT 4 $^{\circ}$ C 可放置一个月。
2) 吸取使用量的缓冲液 SE 加入 0.2% β -巯基乙醇备用。

1. 小量酵母培养细胞

- a. 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, 12,000 rpm 离心 30 秒, 尽可能吸弃上清。
- b. 加入 100 μ l 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; 根据酵母量加入约 20 μ l Lytic Enzyme 储液, 充分颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 15-30 分钟消化细胞壁, 中间可颠倒数次帮助消化。

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 $^{\circ}$ 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。

- c. 加入 380 μ l 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。

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。

- d. 加入 280 μ l 96-100%乙醇, 立即吹打混匀, 不要离心。

- e. 接操作步骤项下 3。

2. 中量酵母培养细胞

- a. 收集 2-3ml (约 3×10^7 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。

- b. 加入 300 μ l 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 50 μ l Lytic Enzyme 储液, 充分颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 15-30 分钟消化细胞壁, 中间可颠倒数次帮助消化。

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 $^{\circ}$ 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。

- c. 13,000 rpm 离心 1 分钟, 尽可能吸弃上清。

- d. 加入 350 μ l 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。

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。

- e. 加入等体积 70%乙醇 (DEPC 水配制, 约 350 μ l) 立即吹打混匀, 不要离心。

- f. 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）13,000 rpm 离心 30-60 秒，弃掉废液。
4. 加 700µl 去蛋白液 RW1，室温放置 30 秒，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
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!），12,000 rpm 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，13,000 rpm 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 30-50µl RNase free water（事先在 70-90℃水浴中加热可提高产量），室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。
8. 如果预期 RNA 产量>30µg,加 30-50µl 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)。

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,用户根据需要选择。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。