



Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2017-10-20

酵母总RNA快速提取试剂盒

Yeast Total RNA Kit (离心柱型)

目录号: ZP407

试剂盒组成	ZP407-1 50次	ZP407-2 100次
细胞悬浮液	30 ml	60 ml
酵母裂解液R	50 ml	100 ml
漂洗液RW(加乙醇后使用)	15 ml	2×15 ml
RNase-free ddH ₂ O	10 ml	30 ml
研磨杵	50 个	100 个
RNase-free 吸附柱	50 个	100 个
RNase-free收集管 (2 ml)	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

■ 储存条件

1. 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在37°C水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温(4°C或者-20°C)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°C-25°C)进行。酵母裂解液R可以常温运输, 收到后**4°C避光保存**。
3. 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。

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.



■ 产品介绍

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活RNA 酶，然后总RNA在高离序盐状态下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，漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的RNase free water将纯净RNA从硅基质膜上洗脱。

■ 产品特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的酵母裂解液R配方，可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取RNA纯度更高。
5. 有效的去除了5S在总RNA中含量，提高了纯度。

■ 注意事项

1. 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！
2. 为防止RNA降解，所有离心步骤如未加说明，均在4℃低温进行。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。
3. 酵母裂解液R中含有刺激性有害化合物，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. 考虑到环保问题，本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，用户使用前需要自备氯仿。
5. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析RNA的质量。好的RNA产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体RNA带，分别为~5Kb（28S），~2Kb（18S），条带亮度比值约为2:1。有时候也可以看到~0.1kb和0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到4, 5条带也属于正常现象，如果RNA未成熟的前体或者不均一核RNA、小核RNA提取出来也可能看到介于7Kb和15Kb之间的不连续的高分子量条带。
6. 检测OD260/OD280吸光度比值时，RNA样品应该溶于TE后检测，如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和PH值低，会使OD280升高，从而使比值降低。
7. 加入酵母裂解液R匀浆后，加氯仿前，样品可在-60℃-70℃保存一个月以上。



■ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入指定量乙醇！

1. 破壁处理：

酶解法

- (1) 取酵母细胞（最多不超过 5×10^7 cells），12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心1分钟，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
- (2) 向留有菌体沉淀的离心管中加入500 μ l 细胞悬浮液，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀，37°C 温浴15分钟-30分钟，每隔5-10分钟颠倒混匀数次。
12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心2分钟，尽量吸净上清。

注意：以上为 5×10^7 酵母细胞的Lyticase用量，根据酵母的菌株和酵母细胞数量的不同，所用孵育时间应该进行适当调整。

液氮研磨法：推荐方案

如果酵母菌样品足够多，可以收集0.5-1g湿菌，用纸巾尽可能吸干水分后用大量液氮研磨后，取大约50-100mg的酵母粉提取。少量操作时候可以用试剂盒中提供的1.5ml 离心管专用研磨棒进行液氮研磨。

注意：为更好的研磨，可以把研钵放在-70°C中预先冷却使用。

2. 匀浆处理：（1.5ml Eppendorf管中操作）

裂解破壁后的酵母菌，加入1ml酵母裂解液R，振荡10秒混匀裂解细胞抽提。

3. 匀浆后，在2~8°C的条件下以12,000rpm离心5分钟，移除匀浆中不溶解的物质，余下的沉淀中包含有细胞外膜、多糖、以及高分子量DNA，而上层的超浮游物含有RNA。将上清液转入一个新的无RNase的1.5mleppendorf管中。（含油脂较高的组织细胞在最上层可能出现油脂层，可吸去上层油脂，取中间层。）
4. 每1ml 酵母裂解液R加 0.2ml氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡10秒，冰浴静置1分钟。
5. 于4°C 12,000rpm 离心10分钟，样品会分成三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相，RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加酵母裂解液R体积的60%，把水相转移到一新的离心管中。

建议：由正中插入液面下缓慢吸取大约500ul上相，避免扰动带RNase 的中间层，不必要尽可能多的吸取含RNA的水相。

6. 加入1/2体积**无水乙醇**，颠倒混匀（此时可能会出现沉淀）。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱中（吸附柱套在收集管内）。
7. 12,000rpm 离心45秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
8. 加入600μl 漂洗液RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心5-30秒，弃掉废液。
9. 加入500μl漂洗液RW，12,000 rpm 离心5-30秒，弃掉废液。
10. 将吸附柱放回空收集管中，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。
11. 取出吸附柱，放入一个RNase free离心管中，置于室温放置2-3分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
12. 根据预期RNA产量**在吸附膜的中间部位**加50-100μl RNase free H₂O，室温放置30秒，12,000 rpm 离心1分钟。
洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要RNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于50μl，体积过小降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。
13. 电泳推荐方案：用3mm×1mm小梳子，初始量为5ul电泳。
电泳电压4-10v/cm，电泳时间20-25分钟。



■ 问题与解决方法

问题	评论与建议
RNA产量低	* 样品裂解或者匀浆不彻底-建议：液氮研磨的时候尽量研磨完全，加入裂解液R后剧烈震荡或者用枪头吹打帮助裂解。匀浆步骤可以提高产量。新鲜组织或者植物组织可以不需液氮，在干净研钵内加入适量裂解液R直接研磨。 * 使用的样品或者裂解物在-20℃或者-70℃存放太久。 -建议：存放时间过长可能降低RNA产量，应尽快处理样品或者裂解物。 * 组织本身含RNA少-建议：不同类型的组织和细胞含有不同量的RNA,对于含量少的组织应该适当提高起始处理量。 * 超过了吸附柱的最大吸附能力-建议：同一个样品使用多个吸附柱，然后合并得到RNA。 * 漂洗液RW内忘记加乙醇-建议：第一次实验时，漂洗液RW瓶中加入指定量无水乙醇。
OD_{260}/OD_{280} 吸光度比值<1.6	* 分光光度计检测吸光度时，RNA样品不是溶于TE，而是溶于水。低离子浓度和低pH条件下，OD280值会较高，造成比值低。-建议：检测时用TE稀释样品。 * 污染了蛋白或者苯酚-建议：做步骤4吸取取上清水相的时候小心不要吸取到中间相和下层有机相，确保做了步骤8。
下游的RT-PCR 实验不成功	* 忘记做步骤9，或者将吸附柱取出时下端碰到了收集管里面的漂洗液，造成洗脱下来的RNA含有乙醇，乙醇抑制了逆转录反应-建议：确保做了步骤9，然后小心取出吸附柱，可以在空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。

■ 问题与解决方法

问题	评论与建议
基因组 DNA污染	* 起始样品量超出了裂解液R的处理范围-建议：选择合适的起始处理量。 * 样品中含有有机溶剂（如乙醇，DMSO等），强缓冲液或碱性溶液。-建议：避免这些可以改变裂解液R性质或者PH值的物质。。 * 吸取上清时吸入了中间相-建议：做步骤4吸取取上清水相的时候小心不要吸取到中间相。
RNA降解， 完整性不佳	* RNA提取所用各种物品和试剂没有灭活RNA酶-建议：按照注意事项准备RNA提取的各种用品。 * 组织取出后没有马上处理或冷冻，提取前已经降解-建议：组织应该尽量立刻处理，不能及时处理的应该尽快保存于液氮或者-70℃。 * 提取的RNA样品没有保存在-20℃或-70℃低温-建议：尽可能的将RNA保存在-70℃的低温。 * 样品提取过程中降解-建议：提取动作应该尽可能的快，离心应该低温进行，取用RNA时尽量冰上进行。