版本号:230902

EASYspin Yeast RNA Kit
EASYspin 酵母 RNA 快速提取试剂盒

目录号：RN10

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(RN1001)
缓冲液 SE	室温	15 ml
裂解液 RLT	室温	20 ml
去蛋白液 RW1	室温	35 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇
RNase-free H_2O	室温	5 ml
Lytic Enzyme	−20°C	2.5 ml
RNA 吸附柱 和收集管	室温	50 套

本试剂盒按照指示温度储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项：

1. 试剂盒全部组分可以常温运输，收到后室温保存（低温组分置−20℃保存）。
2. 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。
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。

❖ 产品介绍：

本制品经 lytic Enzyme 处理去除酵母细胞壁配合独特的裂解液，不需要苯酚/氯仿。适用于从多种酵母中高效提取高纯度、高质量的总 RNA。得到的总 RNA 纯度高，gDNA 残留少，无蛋白和其他杂质污染，可用于 RT-PCR、RT-qPCR、RNA 高通量测序建库、芯片分析等多种下游实验。

❖ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，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. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 20 分钟内完成。
3. RNA 完整性极好不降解 ，电泳图 28S:18S 典型比值大于 2:1 。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 2.1-2.2（100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右，很多公司的产品因为残留蛋白或 DNA 较多，造成比值降低，无法达到 2.2 这个纯度标准，因此降低要求 1.9−2.0 就凑合使用了，但是科尔普的产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准）。
5. 最后空甩离心步骤能彻底去除乙醇残留，离心后可以直接洗脱，不用增加开盖/晾干乙醇/关盖等繁琐步骤。

❖ 注意事项

1. **所有离心步骤均在室温完成，**使用转速可以达到13, 000 rpm的离心机。
2. 自备乙醇，Beta巯基乙醇、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. 本试剂盒可去除体系中绝大部分的DNA污染，纯化获得的RNA通常无需使用DNase I处理即可用于下游实验操作。如果下游实验对痕量DNA十分敏感，可以使用DNase I进一步清除DNA污染（科尔普货号：RN45）。以后提取时购买DNA酶柱上消化试剂盒在提取中去除DNA(科尔普货号：RN34)前可先索取具体操作说明书。

❖ 操作步骤

⇨ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶按照标签说明加入无水乙醇!

⇨ 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 µl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT 4℃可放置一个月。

⇨ 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，13, 000 rpm 离心 30 sec，尽可能吸弃上清。

b. 加入 100 µl 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 µl Lytic Enzyme 储液，充分颠倒混匀，37°C 温育 15−30 min 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°C 来提高效果。

▲ 一般常见酵母毕赤酵母、酿酒酵母等等都有良好效果，如果 Lytic Enzyme 消化效果差的酵母种类可选用其它方法如 0.5 mm 玻璃珠涡旋击打 ，反复冻融等。包括可以使用酵母溶壁酶（Lyticase）处理提高效果。

c. 加入 380 µl 裂解液 RLT（确认已经加入**β-巯基乙醇至终浓度 1%**），吹打混匀后剧烈振荡 20 sec，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, 000 rpm 离心 3 min，沉淀不能裂解的碎片或不溶物，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 µl 无水乙醇，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 2−3 ml （约 3×10^7 细胞）处于**对数生长期**酵母培养物到 1.5 ml 离心管（超过 1.5 ml 可分两次在同一个离心管内进行收集细胞），13, 000 rpm 离心 30 sec，尽可能吸弃上清。

b. 加入 300 µl 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 µl Lytic Enzyme 储液，充分颠倒混匀，37°C 温育 15−30 min 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°C 来提高效果。

▲ 一般常见酵母毕赤酵母、酿酒酵母等等都有良好效果，如果 Lytic Enzyme 消化效果差的酵母种类可选用其它方法如 0.5 mm 玻璃珠涡旋击打 ，反复冻融等。包括可以使用酵母溶壁酶（Lyticase）处理提高效果。

c. 加入 350 µl 裂解液 RLT（确认已经加入**β-巯基乙醇至终浓度 1%**），吹打混匀后剧烈振荡 20 sec，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. 加入等体积 70%乙醇（DEPC 水配制，约 350 µl）立即吹打混匀，不要离心。

▲ 如手头没有 70%乙醇也可以加入 0.5 倍体积无水乙醇（约 200 µl ）。

e. 接**操作步骤**项下 3。

3. 将混合物加入一个吸附柱中，（吸附柱放入收集管中）13, 000 rpm 离心 30-60 sec，弃掉废液。
4. 向通用柱中加入 700 µl 去蛋白液 RW1，室温放置 1 min，13, 000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。
5. 向通用柱中加入 500 µl 漂洗液 RW（使用前请检查是否已加入无水乙醇），13, 000 rpm 离心 15 sec，弃滤液。
6. 重复步骤 7 一遍。
7. 将通用柱放回收集管中，13, 000 rpm 离心 2 min。

   ▲ 空甩作用是尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
8. 将通用柱转移至新的 1.5 ml 离心管中，向吸附柱膜中央悬空滴加 30-50 µl 的 RNase-free ddH_2O，静置 1 min，13, 000 rpm 离心 1 min。

   ▲ 洗脱体积建议不少于 30 µl，体积过小会影响核酸回收效率。

   ▲ 以下步骤都可以帮助提高 RNA 产物浓度：

   RNase-free ddH_2O 于 90°C 预热；

   将第一次洗脱液重新加入吸附柱进行洗脱，两次洗脱可以提高浓度约 10%。
9. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或-85°C ~ -65°C 保存。