

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

# SPARKeasy Yeast RNA Kit

## 酵母RNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC0501

### 01/产品组分

| 序号 | 组分                          | 50 次<br>AC0501               |
|----|-----------------------------|------------------------------|
| 1  | 缓冲液 SE                      | 30 mL                        |
| 2  | Lytic Enzyme                | 2.5 mL                       |
| 3  | 裂解液 RLT                     | 20 mL                        |
| 4  | 去蛋白液 RW1                    | 40 mL                        |
| 5  | 漂洗液 RW                      | 10 mL<br>第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇 |
| 6  | RNase Free H <sub>2</sub> O | 10 mL                        |
| 7  | RNase Free<br>吸附柱 RA 和收集管   | 50 套                         |
| 8  | RNase-Free 收集管(1.5 mL)      | 50 个                         |

### 02/保存条件

Lytic Enzyme 于-20°C保存, 其他组分室温 (15-25°C) 保存。

### 03/产品概述

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, 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去蛋白、漂洗的步骤将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase Free H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。一般来说, 酵母细胞样本量为  $2 \times 10^8$  时, 可提取的 RNA 量为 30-100 μg, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的值在 1.8-2.0 之间, 可满足下游实验应用。该产品可在 50 min 内完成样品 RNA 的提取, 提取的总 RNA

完整性好，无蛋白和基因组 DNA 污染。

## 04/自备材料

无水乙醇、β-巯基乙醇

## 05/注意事项

### 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量无水乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- ◇ 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。
- ◇ 操作前在裂解液 RLT 中加入β-巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 mL 裂解液 RLT 中加入 10 μL β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的裂解液 RLT 4°C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。

## 06/使用方案

### 1. 样品处理：

#### ◆小量酵母培养细胞

- a. 收集 1 mL (约  $10^7$  细胞) 处于对数生长期酵母培养物到 1.5 mL 离心管，12,000 rpm (13,400×g) 离心 30 s，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，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，不适合 Lytic Enzyme 消化的酵母可选用其它方法如 0.5 mm 玻璃珠涡旋击打，反复冻融等。
- 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%)，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 s，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 12,500 rpm (14,500×g) 离心 3 min，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 μL 96%-100%乙醇，立即吹打混匀，不要离心。
- e. 接操作步骤 2。

#### ◆中量酵母培养细胞

- a. 收集 2-3 mL (约  $3 \times 10^7$  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)，12,000 rpm (13,400×g) 离心 30 s，尽可能吸弃上清。

b. 加入 300  $\mu\text{L}$  缓冲液 SE 中（确认已经加入 $\beta$ -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  $\mu\text{L}$  Lytic Enzyme，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，不适合 Lytic Enzyme 消化的酵母可选用其它方法如 0.5 mm 玻璃珠涡旋击打，反复冻融等。

c. 12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心 1 min，尽可能吸弃上清。

d. 加入 350  $\mu\text{L}$  裂解液 RLT（确认已经加入 $\beta$ -巯基乙醇至终浓度 1%），吹打混匀后用手剧烈振荡 20 s，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 12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心 3 min，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  $\mu\text{L}$ ）立即吹打混匀，不要离心。

f. 接操作步骤 2。

2. 将混合物加入一个吸附柱 RA 中（吸附柱放入收集管中），12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心 30-60 s，弃掉废液。

3. 加 700  $\mu\text{L}$  去蛋白液 RW1，室温放置 30 s，12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心 30 s，弃掉废液。

▲如果 DNA 残留明显，可在加入去蛋白液 RW1 后室温放置 5 min 再离心。

4. 加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心 30 s，弃掉废液。加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液 RW，重复一遍。

5. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

6. 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 30-50  $\mu\text{L}$  RNase Free H<sub>2</sub>O（事先在 70-90°C 水浴中加热可提高产量），室温放置 1 min，12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心 1 min。

7. 如果预期 RNA 产量 > 30  $\mu\text{g}$ ，加 30-50  $\mu\text{L}$  RNase Free H<sub>2</sub>O 重复步骤 6，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）。

▲使用第一次洗脱液重复洗脱两遍的 RNA 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。

## 07/流程简图



## 08/相关产品

- AA0301 SPARKeasy 酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒
- AD0401 SPARKeasy 酵母高纯质粒小量快速提取试剂盒（含 Lytic Enzyme）
- AD0501 SPARKeasy 酵母高纯度质粒大量快速提取试剂盒
- AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit（With gDNA Eraser）
- AG0305 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR（With gDNA Eraser）
- AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix（With ROX）

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

