

Yeast RNAiso Kit

酵母 Total RNA 提取试剂盒

Takara Code : D300

包装量 : 100 次量

Shipping at 4°C
Stored at 4°C

● 制品说明

本制品主要应用于酵母菌 Total RNA 的提取。本制品中的 Yeast RNAprep Buffer 在适当的温度下能够去除酵母菌的细胞壁, 从而形成原生质体, 再在 RNAiso Plus 的作用下使细胞裂解, 释放核酸, 达到 RNA 提取的目的。避免了传统的液氮研磨等方法, 省时省力, 方便对多个样品同时进行提取。

本制品适用于毕赤酵母、酿酒酵母以及深红酵母等大多数酵母菌的 Total RNA 提取。经本制品提取的酵母菌 Total RNA 纯度高, 基本不含蛋白质及基因组 DNA, 提取的 RNA 可以直接用于 Northern 杂交、斑点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RNA 分解酶的保护分析、RT-PCR、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

● 制品内容

组份名称	包装量
RNAiso Plus	100 ml
Yeast RNAprep Buffer*	40 ml
RNase-free dH ₂ O	10 ml

* 含有酵母细胞破壁酶, 不可在高于 4°C 的环境下长期存放, 使用后应立即存放于 4°C 环境下。

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆ 氯仿
- ◆ 异丙醇
- ◆ 75% 乙醇 (DEPC 处理水配制)

● RNA 提取实验前的准备

RNA 制备的关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此, 在实验中必须采取以下措施: 戴一次性干净手套; 使用 RNA 操作专用实验台; 在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

【使用器具】

尽量使用一次性塑料器皿, 若用玻璃器皿, 应在使用前按下列方法进行预处理。

用 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在 37°C 下处理 12 小时。然后在 120°C 下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

RNA 实验用的器具建议专门使用, 不要用于其它实验。

【试剂配制】

用于 RNA 实验的试剂, 须使用干热灭菌 (180°C, 60 分钟) 或使用上述方法进行 DEPC 水处理灭菌后的玻璃容器盛装 (也可以使用 RNA 实验用的一次性塑料容器), 使用的无菌水须用 0.1% 的 DEPC 处理后再进行高温高压灭菌。

RNA 实验用的试剂和无菌水都应专用, 避免混用交叉污染。

● 实验操作

1. 酵母细胞的裂解。

- ① 取 1 ml OD₆₀₀ 值为 1.5~2.5 液体培养的酵母菌到 1.5 ml Microtube 中, 8,000 g 4°C 离心 2 分钟。
* OD₆₀₀ 最好不要超过 4.0, 否则提取的 Total RNA 的质量和收量都会有所下降。
- ② 小心弃去上清, 向沉淀中缓慢加入 1 ml 冰预冷的 dH₂O, 用移液枪轻轻吹打, 使沉淀重悬。
- ③ 8,000 g 4°C 离心 2 分钟。小心弃去上清, 尽量除净液体。
- ④ 沉淀中加入 0.4 ml 的 Yeast RNAprep Buffer, 用移液枪轻轻反复吹打, 使沉淀重悬。
- ⑤ 放入 30°C 水浴中温浴 1 小时, 其间轻轻振荡离心管 1~2 次。
- ⑥ 将离心管从 30°C 水浴中取出, 12,000 g 4°C 离心 5 分钟。
- ⑦ 小心弃去上清, 向沉淀中加入 1 ml 的 RNAiso Plus, 用移液枪轻轻吹打, 使沉淀重悬。
- ⑧ 盖紧离心管盖, 漩涡振荡 2~5 分钟, 至悬浊液澄清。12,000 g 4°C 离心 5 分钟。
- ⑨ 小心吸取上清液, 移入新的 1.5 ml 的 RNase-free 的 Microtube 中 (切勿触及沉淀)。

2. 酵母 RNA 的提取。

- ① 向上述裂解液中加入氯仿 (RNAiso Plus 的 1/5 体积量), 盖紧离心管盖, 用手剧烈振荡 15 秒 (氯仿沸点低、易挥发, 振荡时应小心离心管盖突然弹开)。待溶液充分乳化 (无分相现象) 后, 再室温静置 5 分钟。
- ② 12,000 g 4°C 离心 15 分钟。
- ③ 从离心机中小心取出离心管, 此时溶液分为三层, 即: 无色的上清液、中间白色蛋白质层及带有颜色的下层有机相。吸取上清液转移至另一新的离心管中 (切忌吸出白色中间层)。
- ④ 向上清液中加入等体积的异丙醇, 上下颠倒离心管充分混匀后, 在 15~30°C 下静置 10 分钟。
- ⑤ 12,000 g 4°C 离心 10 分钟。一般在离心后, 试管底部会出现沉淀。

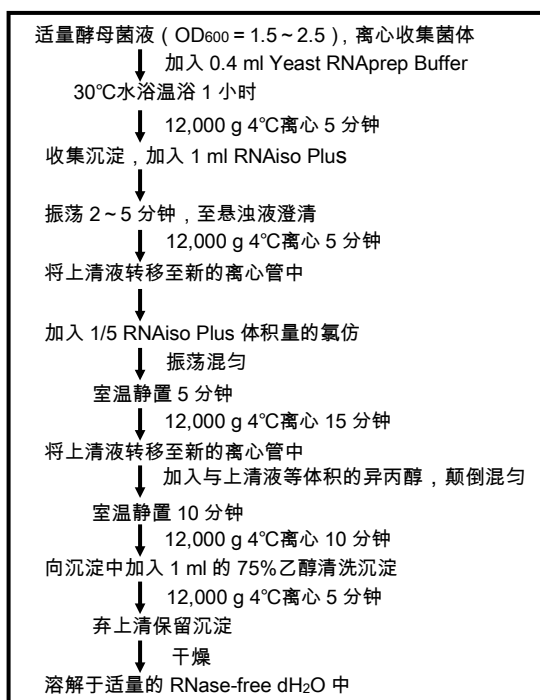
3. RNA 沉淀的清洗。

小心弃去上清, 缓慢地沿离心管壁加入 75% 的乙醇 1 ml (切勿触及沉淀), 轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁, 12,000 g 4°C 离心 5 分钟后小心弃去乙醇 (为了更好地控制 RNA 中的盐离子含量, 应尽量除净乙醇)。

4. RNA 的溶解。

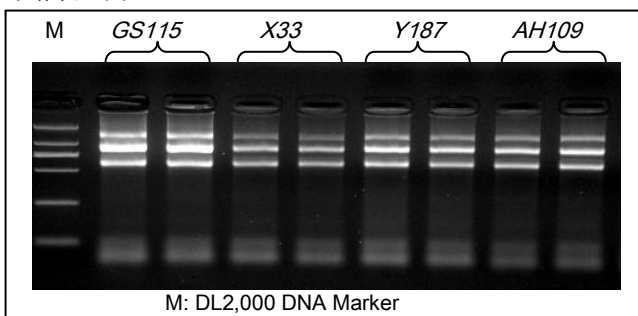
室温干燥沉淀 2~5 分钟 (不可以离心或加热干燥, 否则 RNA 将会很难溶解, 有关 RNA 溶解可以参考 Troubleshooting 中的相关说明), 加入适量的 RNase-free dH₂O 溶解沉淀, 必要时可用移液枪轻轻吹打沉淀, 待 RNA 沉淀完全溶解后于 -80°C 保存。

●酵母菌 RNA 提取操作流程简图



●实验例

使用本试剂盒提取四种常用酵母菌的 Total RNA，琼脂糖凝胶电泳结果如下。



●Troubleshooting

1. Yeast RNAiso Kit 是否对所有的酵母菌都适用？

一般情况下，Yeast RNAiso Kit 适用于所有对酵母细胞破壁酶敏感的酵母菌 Total RNA 的提取。

我们使用该试剂盒成功地提取了 *Pichia* (GS115、X33)、*Saccharomyces* (Y187、AH109) 以及 *Candida* (*candida tropicalis*) 的 Total RNA。下表是文献报道的使用 Yeast RNAprep Buffer 能够成功裂解的酵母菌细胞壁的菌种一览表。

菌种名称	
1. <i>Schizosaccharomyces</i>	10. <i>Graphioli phoenicis</i>
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11. <i>Brettanomyces</i>
3. <i>Hansenula marakii</i>	12. <i>Candida colliculosa</i>
4. <i>Kluyveromyces lactis</i>	13. <i>Tremella mesenterica</i>
5. <i>Pichia anomala</i>	14. <i>Candida utilis</i>
6. <i>Lipomyces starkeyi</i>	15. <i>Kloeckera apiculata</i>
7. <i>Filobasidium floriforme</i>	16. <i>Trigonopsis variabilis</i>
8. <i>Ustilago maydis</i>	17. <i>Cryptococcus albidus</i>
9. <i>Rhodospodium toruloides</i>	18. <i>Phaffia rhodozyma</i>

2. 细胞不能完全裂解，为什么？

细胞数量太多，裂解液不能完全裂解菌体细胞。如果开始向 Yeast RNAprep Buffer 中加入的细胞过多，则溶液将会变得十分粘稠，细胞会聚集成团，使裂解作用不充分。在此种情况下可以适当多加入一些 Yeast RNAprep Buffer。

3. 加入 RNAiso Plus 之后裂解液不澄清，为什么？

① Yeast RNAprep Buffer 失效：确保 Yeast RNAprep Buffer 在 4°C 保存，不要在高于 4°C 的环境下放置太长时间。

② 细胞过多使裂解不充分：我们建议 1 ml OD₆₀₀ = 1.5 ~ 2.5 的菌体细胞使用 0.4 ml Yeast RNAprep Buffer 裂解，如果菌体量增加，应相应增加 Yeast RNAprep Buffer 的添加量。

4. 提取后的 RNA 进行 OD 值测定时，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值 < 1.65，为什么？

① RNA 应使用 TE Buffer 稀释后再进行吸光度值的测定，低离子强度或低 pH 值会使 OD₂₈₀ 值升高。样品裂解时加入的 RNAiso Plus 量偏少，造成蛋白质变性不充分，可以再次对 RNA 溶液进行苯酚/氯仿抽提，以除去蛋白质。

② 苯酚/氯仿抽提相分离后，吸取上清液时不小心接触蛋白质层造成污染。

③ RNA 未充分溶解。

5. RNA 提取量较低怎么办？

① 细胞未能完全裂解。一般来说，每 0.4 ml Yeast RNAprep Buffer 可以对 OD₆₀₀ = 1.5 ~ 2.5 (5 × 10⁷) 的菌体细胞进行裂解，得到约 15 ~ 30 μg 的 Total RNA。在相同体积的 Yeast RNAprep Buffer 中加入的细胞数量过多会造成提取量降低。可以将 Yeast RNAprep Buffer 的使用量加倍以提高 Total RNA 的收量。

② 菌体细胞生长超过对数生长期。如果菌体细胞的 OD₆₀₀ > 4.0，会造成 Total RNA 的收量明显下降。建议在酵母菌细胞的对数生长期中期时 (毕赤酵母菌 OD₆₀₀ = 1.5 ~ 2.5) 进行 Total RNA 的提取。

③ 相分离后请尽量完全回收上清液。

④ RNA 未能完全溶解。不要使 RNA 沉淀过于干燥，在加入 DEPC 水后将样品在室温溶解 5 ~ 10 分钟使其充分溶解。

6. 提取的 RNA 降解，为什么？

① 细胞生长超过对数生长期有时会造成提取的 RNA 降解。建议在酵母菌细胞的对数生长期中期时 (毕赤酵母菌 OD₆₀₀ = 1.5 ~ 2.5) 进行 Total RNA 的提取。

② 菌体细胞反复冻融会造成细胞内的 RNA 降解。建议收集菌体后立即进行 Total RNA 的提取，不要反复冻融。

③ 提取 RNA 时使用的试剂及器材中混有 RNA 分解酶。

7. 提取的 RNA 中含有 DNA 污染，为什么？

① 裂解细胞时使用的 RNAiso Plus 量偏少。

② 相分离时不要接触到中间的蛋白质层。

③ 如果提取的 RNA 中含有 DNA 污染时，可以使用 Recombinant DNase I (RNase Free; Takara Code: D2270A) 进行 DNA 消化。

注意事项

本制品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会中毒、导致灼伤以及其他身体伤害。使用本制品时应穿戴防护物品，如防护服、手套、眼罩、面罩等。如果不小心接触到眼睛时，应立即用大量的水冲洗以及前往医院治疗；接触到皮肤时，应立即用大量的聚乙二醇 400 (Polyethylene glycol 400) 冲洗，严重时请前往医院治疗；使用本制品后感觉不舒服时请前往医院治疗。

