

**Flying Shark™ Yeast RNA Kit (DNase I)**  
**酵母 RNA 提取试剂盒 (DNase I)****目录号: RNE25****试剂盒组成**

Component	RNE25 (50 preps)
DNase I	1 ml (1000 U)
10× Reaction Buffer	1 ml
Buffer HL	45 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
RNase-free H <sub>2</sub> O	10 ml
Spin Columns RA with Collection Tubes	50

**保存方法**

DNase I 及 10×Reaction Buffer -20°C保存, 其它组分室温 (15-30°C)。



本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

## 产品介绍

本试剂盒配备强力裂解液 HL，适用性非常广泛，适用于从培养的**酵母细胞中提取高质量 RNA**。

独特的裂解液配方，迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，有效去除多糖、蛋白等对 RNA 提取的影响，无需苯酚、氯仿等试剂。采用硅基质吸附膜（Spin Columns RA）对 RNA 进行吸附纯化，同时**高品质 DNase I 直接在柱上消化残留的 DNA**，使得提取的总 RNA 纯度高，无 DNA、蛋白质和其它杂质的污染，可直接用于 Real Time RT-PCR、RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译和分子克隆等多种下游实验。

## 自备试剂

无水乙醇

## 菌体浓度检测

可采用分光光度计或平板培养法检测菌体量，一般对于酿酒酵母，OD600 值为 1.0 时，相当于  $1-2 \times 10^7$  cells/ml。

## 实验前准备及重要注意事项

1. 使用 RNase-free 的离心管和吸头；避开经常使用 RNase 的区域，以免 RNase 气溶胶污染。
  2. 提取的样品避免反复冻融，否则影响 RNA 提取得率和质量。
  3. 低温时如果 Buffer HL 产生沉淀，请水浴加热使其溶解后使用。
  4. 第一次使用 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。
  5. 液氮研磨后，酵母细胞被破坏，内源性 RNase 被释放出来，若此时失去低温的保护，RNA 容易被内源性 RNase 降解，因此**建议研磨样品前先准备好 Buffer HL，再进行研磨，并将研磨好的粉末迅速转入 Buffer HL 中混匀**，RNA 在 Buffer HL 中不会降解。
-

**操作步骤** (以下所有离心步骤均在室温下进行)

1. 取 **600  $\mu$ l Buffer HL** 至 1.5 ml 离心管中备用。
2. **酵母破壁**: 取酵母细胞 (最多不超过  $5 \times 10^7$  cells), 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1 min, 吸净上清 (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)。将细胞沉淀在液氮中迅速研磨成粉末, 立即转入装有 Buffer HL 的离心管, 剧烈振荡混匀, 彻底匀浆, 不要有聚集成团的细胞团块。  
**注意: 液氮研磨法可以有效去除酵母细胞壁。也可以用其他破壁方法如 Lyticase 消化, 玻璃珠涡旋等。请确保破壁充分, 否则会导致 RNA 产量低。**
3. 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 3 min 沉淀不溶物, 小心吸取上清液 ( $\leq 500 \mu$ l 足够) 到一个新的离心管。
4. 加入 **0.5 倍** 上清体积的无水乙醇, 涡旋混匀 (此时可能会出现沉淀), 将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns RA) 中, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
5. 向吸附柱 RA 中加入 **350  $\mu$ l Buffer RW1**, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
6. 配制 DNase I 混合液: 取 **52  $\mu$ l RNase-Free H<sub>2</sub>O**, 向其中加入 **8  $\mu$ l 10 $\times$ Reaction Buffer** 和 **20  $\mu$ l DNase I (1 U/ $\mu$ l)**, 轻柔混匀, 配制成终体积为 80  $\mu$ l 的混合液。处理多个样品可按比例放大配制混合液。
7. 向吸附柱硅胶膜上加入 **80  $\mu$ l DNase I 混合液**, 室温 (20-30 $^{\circ}$ C) 放置 15 min。
8. 向吸附柱 RA 中加入 **350  $\mu$ l Buffer RW1**, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
9. 向吸附柱 RA 中加入 **600  $\mu$ l Buffer RW2** (使用前检查是否加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
10. 重复步骤 9。
11. 将吸附柱放回空收集管内, 12,000 rpm 离心 2 min。  
**注意: 这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇, 乙醇残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。**
12. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 **30-50  $\mu$ l RNase-Free H<sub>2</sub>O**, 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 得到 RNA 溶液, -70 $^{\circ}$ C 保存, 防止降解。  
**注意: RNase-Free H<sub>2</sub>O 体积不应少于 30  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。**

---

---