

# R6870 Yeast RNA Kit

## 简易中文步骤

√实验前请按说明书正确稀释或配制以下溶液

➤ 制备 Buffer SE/Lyticase 混合液:

货号	配制方法
R6870-00	将整管 Lyticase 溶于 10mL 的 SE Buffer 中
R6870-01	将整管 Lyticase 溶于 100mL 的 SE Buffer 中
R6870-02	将 4 管 Lyticase 溶于 400mL 的 SE Buffer 中

Note: 每 1mL SE Buffer 加入 10 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇

➤ 使用【无水乙醇】对 RNA Wash Buffer II 进行稀释, 稀释后室温保存

货号	加入量
R6870-00	8mL
R6870-01	48mL
R6870-02	48mL (每瓶)

- 在阴凉的环境下, Buffer YRL 可能会形成结晶, 这是正常现象, 使用前可将瓶子稍稍加热令其溶解。
- $\beta$ -巯基乙醇是变性 RNase 的关键, 使用前, 每 1mL Buffer YRL 加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇, 加入后该混合液可在室温下储存 1 个月。

### 提取步骤:

1. 用 15mL 离心管, 收集不超过  $2 \times 10^7$  个酵母细胞, 在 4°C, 1,000xg 离心 5min 收集酵母;

Note: 只能使用新鲜培养的酵母细胞来制备原生质体。

2. 弃去培养基。加入 2mL Buffer SE/Lyticase 混合液, 涡旋重悬酵母, 30°C 孵育 30min, 孵育期间每隔 10min 就取出颠倒混匀一次;

3. 室温下, 400xg 离心 5min, 小心吸除上清液, 残留的上清液会影响到下游实验;

4. 加入 350 $\mu$ l Buffer YRL/ $\beta$ -巯基乙醇和 50mg glass beads, 最大速度涡旋混匀 5min。如果有珠磨仪, 可在最大速度研磨至匀浆;

5. 13,000xg 离心 3min, 转移上清液至新的离心管;

6. 加入等体积 70% 的乙醇, 用枪上下吸打混匀。如果出现沉淀, 用枪上下吸打将沉淀打散, 沉淀不会影响下游 RNA 的纯化, 不要离心去除沉淀。

7. 将 HiBind® RNA Mini column 套入到 2mL 收集管中，转移不超过 700µl 步骤 6 中混合液至柱子中，室温下， $\geq 10,000\times g$  离心 30-60s，弃滤液；

Note: 可在此步后进行 DNase I 消化。如果需要 DNase I 消化，请跳过步骤 8 按照步骤 9 进行，如果不需要 DNase I 消化，只需按照步骤 8，跳过步骤 9 进行实验；

8. 将 HiBind® RNA Mini column 套入到 2mL 收集管中，加入 700µl RNA Wash Buffer I，室温下  $10,000\times g$  离心 30-60s，弃滤液；

9. (选做) DNase I 消化

将混合液从 HiBind® RNA Mini column 过柱后，在没有 DNase 处理的情况下能将大部分的 DNA 除去，因此对于大多数下游实验来说，没必要再进行 DNase I 消化步骤。但是，对于某些敏感的 RNA 实验可能需要进一步去除 DNA (有关的详细信息，可以查阅 DNase I 货号: E1091)

a. 加入 300µl RNA Wash Buffer I 到 HiBind® RNA Mini column 中， $10,000\times g$  离心 30-60s，弃滤液，将 HiBind® RNA Mini column 套入 2mL 收集管中。

b. 按下表要求准备消化液。

组分	加入量
OBI DNase I Digestion Buffer	73.5µl
RNase-free DNase I (20 Kunitz unites/µl)	1.5µl
总体积	75µl

Note:

- DNase I 对物理变性非常敏感，因此不要涡旋 DNase I 混合液。可以通过倒置管轻轻混合。在 RNA 分离之前准备新鲜的 DNase I 消化混合液。
  - OBI DNase I Digestion Buffer 配有 OBI RNase-free Dnase 装置。
  - 标准 DNase Buffer 与膜上 DNase 消化不相容。
- c. 将柱子离心 30s 干燥,把上述 75µl DNase I 消化液直到加到柱子的膜的正中央。不要让消化液转移至柱子的 O 圈或柱子的内壁。不然会降低的酶切效率。
- d. 室温下 (25-30°C) 放置 15min。
- e. 将 HiBind® RNA Mini column 套入 2mL 收集管中，加入 400µl RNA Wash Buffer I，放置室温 5min， $10,000\times g$  离心 15s，弃滤液。

10. 将 HiBind® RNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 500µl RNA Wash Buffer II， $10,000\times g$  离心 30-60s，弃滤液；

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

11. 将 HiBind® RNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 500µl RNA Wash Buffer II， $10,000\times g$  离心 30-60s，弃滤液；

12. 将 HiBind® RNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，最大速度 (10,000xg) 空柱子离心 2min 干燥；

13. 将 HiBind® RNA Mini column 套入新的 1.5mL 离心管中，加入 30-50  $\mu$ l DEPC-treated water，最大速度离心 1min 洗脱 RNA。如有必要可第二次加入 50 $\mu$ l 洗脱，加入更多的 DEPC water 进行洗脱，增加额外的洗脱体积可以增加总 RNA 提取的产量，但会降低浓度，一次洗液可以得到 80% 的 RNA，将 DEPC water 预热至 70°C 再加入到柱子中，室温下孵育 5min，再离心洗脱，有助于提高产量。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准