

FastPure Fungi RNA Extraction Kit Handbook

FastPure 真菌样品 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

FastPure RNA Fungi Mini Kit		
产品编号	EK-1309-50T	EK-1309-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer RLT	40mL	80mL
Buffer RW1	32mL	64mL
Buffer RPE	12mL	24mL
Buffer Y1	0.6mL	1.2mL
RNase-Free Water	10mL	20mL
RNase-Free 吸附柱	50 个	100 个
2 mL 收集管	50 个	100 个
使用手册	1	1

产品介绍

本试剂盒可以快速地从小量真菌（酵母）中提取总 RNA，不含酚氯仿等有毒试剂。其提取的总 RNA 纯度高，可用于 RT-PCR、Real Time RT-PCR、mRNA 差异显示、引物延伸分析、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、Slot Blot、Poly A 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品级化妆品等用途。

存储条件

Buffer Y1 收到后置于 -20°C 保存；Buffer RLT 可室温（15°C-25°C）干燥放置至少一年，加入 β-巯基乙醇（或 DTT）的 Buffer RLT 可 4°C 放置一个月；其他试剂室温干燥保存可至少稳定 12 个月。

需要额外准备的材料

- 14.3 M β-巯基乙醇(β-ME) (常规购买商业化商品即为 14.3 M)或 1M DTT 溶液
- 70%乙醇: RNase-free 水配制
- 无水乙醇（96%-100%）
- 无 RNase 酶的 1.5mL 离心管
- 无 RNase 酶的吸头
- 干净的手套
- 高速离心机

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 操作前在 Buffer RLT 中加入 β-巯基乙醇（或 DTT）至终浓度为 1%（建议现配现用，DTT 终浓度为约 40mM），如 1 mL Buffer RLT 中加入 10μL β-巯基乙醇（或 40μL 1M DTT 溶液）。配好的 Buffer RLT 可在 4°C 维持稳定一个月。
- Buffer RLT 在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请 37°C 加热溶解后室温使用。
- Buffer RW1 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 0.25 倍体积的乙醇（96-100%）以获得工作溶液。
- Buffer RPE 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 4 倍体积的乙醇（96-100%）以获得工作溶液。
- RNase-free 水中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染，使用时尽量注意，推荐开瓶后分装保存以减少污染风险保证实验稳定性。
- RNA 在 Buffer RLT 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的无酶离心管或玻璃器皿。

操作步骤:

1. 将真菌溶液 ($\leq 2 \times 10^7$ 新鲜真菌 (或酵母)) 在 4°C 下以 $1000 \times g$ 离心 5 分钟, 在 12mL 或 15mL 的离心管中收集细胞沉淀。

2. 破壁处理 (根据样本类型选择路径 A 或路径 B):

路径 A: 酶消化法 (推荐用于酵母)

- ① 加入 200 μ L 无菌 PBS 将沉淀重悬, 并转移至新的无酶 1.5 mL 离心管中。
- ② 加入 10 μ L Buffer Y1, 在 30°C 下轻轻摇晃孵育 30-40 min。
- ③ 孵育结束后, 直接进入步骤 3 (裂解)。

路径 B: 物理粉碎法 (推荐用于难裂真菌如丝状真菌, 得率更高)

- ① 液氮研磨: 将沉淀在液氮中研磨成精细粉末。
- ② 机械匀浆: 或使用高通量研磨仪/破碎机配合无酶珠子进行粉碎。
- ③ 粉碎完成后, 将样本转移至无酶 1.5 mL 离心管中, 直接进入步骤 3 (裂解)。

3. 加入 350 μ L Buffer RLT 并充分涡旋 1 分钟以裂解真菌。全速 ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 分钟, 弃沉淀并在后续步骤中仅使用上清液。

若离心后上清液仍显著粘稠 (多见于多糖含量高的样本), 可补加 0.5 倍体积 (约 175 μ L) 的 Buffer RLT 稀释混匀。注意: 若补加了 RLT, 步骤 4 的无水乙醇用量也要相应增加, 保持与裂解液总量 1:1 的比例。

4. 在上清液中加入 1 倍体积无水乙醇 (约 350 μ L), 并通过移液混合均匀。不要离心。立即进入下一步。

5. 将上述步骤溶液转移入 RNase-free 吸附柱中并套上 2mL 收集管, $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000 \text{rpm}$) 离心 1min, 弃废液, 直至将溶液全部转移完成吸附。

吸附柱最大上柱量为 700 μ L, 若溶液过多可分多次上柱。后续操作若无特殊说明吸附柱均置于 2mL 收集管中。

6. 向吸附柱中加入 700 μ L Buffer RW1 (使用前请确认 Buffer RW1 按要求加入 0.25 倍体积无水乙醇), $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000 \text{rpm}$) 离心 30s, 弃废液。

7. 将吸附柱重收套回收集管中, 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer RPE (使用前请确认 Buffer RPE 按要求加入 4 倍体积无水乙醇), $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000 \text{rpm}$) 离心 30s, 弃废液。

8. 重复步骤 7 一次。

9. 倒弃滤液, 将吸附柱放入收集管中, 以最大转速 ($\sim 13,400 \times g$) 离心 3 分钟干燥柱子。

10. 将吸附柱套入新的无酶 1.5mL 离心管中, 并置于无酶环境中开盖静置 5-10min 至乙醇晾干。

若吸附柱中残留乙醇将会对纯化后的 RNA 的下游实验造成影响。

11. 向吸附柱膜正中央加入 50-100 μ L RNase-Free Water, 盖上盖子室温静置 2-3 min。后置于离心机中最大转速 ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2min 得到 RNA 溶液。

RNA 洗脱体积不应少于 30 μ L, 否则影响洗脱效率。洗脱后的 RNA 溶液应立即进行下游实验或置于 -80°C 储存。

常见问题:

1. 柱子堵塞

- 样品用量太多: 减少样品用量, 参照说明书中提供用量建议。
- 样品消化不充分: 用液氮或研磨仪充分研磨, 延长研磨时间。

2. RNA 产量低

- 试剂准备有误: Buffer RPE 没有加入乙醇稀释或体积不准确 (乙醇浓度需控制在 80%)。
- 洗脱不充分: 洗脱液需加到膜中央, 增加洗脱体积或次数。

3. RNA 降解严重

- 样品保存有误: 非新鲜现取样品应尽量保存 RNA Holder 等保存液中。
- 提取过程耗材及环境污染: 提取中使用的吸头、离心管等需经无酶处理, 环境应尽量选择无酶环境或洁净环境以减少 RNase 的影响。