

Fungal RNA Extraction Mini Kit

真菌 RNA 小提试剂盒

本产品适合于从 10~200mg 真菌样品中提取总 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，整个提取过程只需 20~30 分钟。试剂盒采用 DNA 过滤技术，可高效地过滤去除 DNA。

产品组份

产品编号	RNF456-01	RNF456-02	RNF456-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
NA Extraction Mini Columns	20	100	500
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer PL	9 ml	40 ml	200 ml
Buffer FLB	9 ml	40 ml	200 ml
Buffer GLB	7 ml	30 ml	150 ml
Buffer W1R	10 ml	40 ml	150 ml
Buffer W2R*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.2 ml	10 ml	60 ml

版本号：2018-12

保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 12 个月。低温下，Buffer PL/FLB 可能会有沉淀形成，37℃ 水浴让沉淀完全溶解。因 RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。推荐分装并保存于 2~8℃，以减少污染。

准备事项

- Buffer W2R 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

实验步骤（简易样品）

1. 液氮研磨：用液氮将真菌样品研磨成细小粉末。称取 10~200mg 粉末至 1.5~2.0ml 预冷的离心管中。
加裂解液前样品不能解冻。初次使用推荐样品量为 30~50mg，根据结果再调整用量。
2. 立即加入 600μl Buffer PL 至样品中，高速涡旋 20~60 秒打散样品，室温静置 5 分钟。
3. 室温，14,000 x g 离心 5 分钟。
4. 把 NA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。把第 3 步的上清液转移至柱子中。12,000 x g 离心 1 分钟，弃去柱子，保留滤液。
5. 加入 0.5 倍体积无水乙醇至滤液中，用移液枪吸打 3~5 次，按过柱纯化 RNA 进行操作。

过柱纯化 RNA

1. 把 NA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。转移 ≤750μl 混合液至柱子中。12,000 x g 离心 1 分钟。
2. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子。12,000 x g 离心 1 分钟。
3. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500μl Buffer W1R 至柱子上。10,000 x g 离心 10 秒。
4. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer W2R(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000 x g 离心 10 秒。
5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer W2R(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000 x g 离心 10 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。13,000 x g 离心 2 分钟。
该步骤去除 NA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50μl 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。
7. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~100μl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 3 分钟。12,000 x g 离心 1 分钟。
柱子最小的洗脱体积是 30μl，若 RNA 产量超过 30μg，推荐进行第二次洗脱。
8. 弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C。

实验步骤（难提取样品）

1. 液氮研磨：用液氮将植物或真菌样品研磨成细小粉末。称取 30~100mg 粉末至 1.5~2.0ml 预冷的离心管中。
 - a) 加裂解液前样品不能解冻。初次使用推荐样品量为 30~50mg，根据结果再调整用量。
2. 立即加入 600 μ l Buffer FLB 和 30 μ l 2-巯基乙醇（自备）至样品中，高速涡旋 20~60 秒打散样品，室温静置 5 分钟。
3. 加入 600 μ l 氯仿，剧烈振荡混匀。室温，14,000 x g 离心 5 分钟。
4. 转移上清至新的离心管，加入等倍体积 Buffer GLB，涡旋混匀。
5. 把 NA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。把第 4 步的混合液转移至柱子中。12,000 x g 离心 1 分钟，将滤液转移至新的离心管中，重复该步骤直至所有混合液过柱转移，丢弃柱子及收集管。
6. 向滤液中加入 0.5 倍体积无水乙醇，涡旋混匀，按过柱纯化 RNA 进行操作。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量，超量样品反而会降低产量和纯度。
- **富含多糖类样品：**降低样品量至 30~50mg。
- **裂解不充分：**加大裂解液的用量，延长裂解液的离心时间以去除高分子量杂质。
- **提高转速**

2. RNA 产量低

- **洗脱不充分：**RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置几分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。

3. RNA 降解

- **RNase Free Water 被污染：**RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的 RNase Free Water 或 DEPC 处理水。
- **样品贮藏问题：**反复解冻会引起 RNA 降解，确保样品解冻次数不要超过 2 次。
- **裂解问题：**液氮研磨后不要让样品解冻，快速加入裂解液并立即打散样品。样品只能充分裂解打散后，内源的核酸酶才能被灭活，RNA 才不会降解。
- **电泳原因：**常见的 RNA 降解现象都是电泳过程中引起的。更换新的 Loading Buffer 和电泳缓冲液。