

Code No. 9089

研究用

---

**TaKaRa**

Yeast Processing Reagent  
(for total RNA preparation)

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存	1
● 其他需要试剂及仪器	1
● 操作方法	2
● 操作流程	3
● 实验例	6
● Appendix	7
● Troubleshooting	7
● 关联产品	8

## ● 制品说明

Yeast Processing Reagent (for total RNA preparation) 是使用NucleoSpin RNA或RNAiso Plus从酵母中提取高纯度total RNA时搭配使用的前处理试剂。使用本制品进行的酵母菌体前处理操作包含通过离心清洗和回收酵母菌体, 通过使用Yeast Processing Enzyme Solution (细胞壁分解酶) 和Yeast Processing Buffer分解酵母细胞壁。由于本制品使用细胞壁分解酶进行前处理, 所以不需要利用玻璃珠及液氮等繁琐的操作。此外, 搭配NucleoSpin RNA使用时也不需要有机溶剂。

通过使用本制品进行前处理, 大部分酵母 (*Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*等) 都可以制备得到用于RNA相关的各基因工程 (RT-PCR等) 实验所需的高纯度的total RNA。标准实验例中, 使用处于对数生长期新鲜的 $2\sim 5 \times 10^7$ 的*Saccharomyces cerevisiae*酵母菌体得到了10~20  $\mu\text{g}$ 高纯度的酵母total RNA。本制品也可用于长时间培养的酵母菌和冷冻酵母菌的total RNA制备。相对于一般反应, 使用处于对数生长期的新鲜酵母菌时, total RNA制备所需的反应时间更短。

### RNA提取相关的试剂

请将本制品与NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250) 或RNAiso Plus (Code No. 9108/9109) 搭配使用。

未确认与其他RNA提取试剂搭配使用的效果。

## ● 制品内容 (20次量)

1. Yeast Processing Buffer	1.6 ml
2. Yeast Processing Enzyme Solution * <sup>1</sup>	160 $\mu\text{l}$
3. RNase-free DNase I * <sup>2</sup>	120 $\mu\text{l}$
4. 10X DNase I Buffer * <sup>2</sup>	80 $\mu\text{l}$

\*1: Yeast Processing Enzyme Solution中含有酶。请勿过度搅拌以避免酶失活。

\*2: 使用RNAiso Plus制备total RNA时根据需要使用。

## ● 保存

-20°C。

## ● 其他需要试剂及器具

- NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250) 或RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)
- 离心机
- 无水乙醇 (>99%)
- 预冷的灭菌水
- 各种反应管
- 恒温槽 (30°C、37°C孵育用)
- RNase-free水
- 1 M DTT 溶液或2-巯基乙醇 (2-ME) \*<sup>1</sup>  
(2-ME为有毒制品, 操作及废弃时请注意。)
- 氯仿 \*<sup>2</sup>
- 异丙醇 \*<sup>2</sup>
- 96~100%乙醇 \*<sup>1</sup>
- 70%乙醇 [使用RNase-free水制备] \*<sup>1</sup>
- 75%乙醇 [使用RNase-free水制备] \*<sup>2</sup>

\*1: 使用NucleoSpin RNA制备total RNA时使用。

\*2: 使用RNAiso Plus制备total RNA时使用。

## ● 操作方法

1. 将 $2\sim 5 \times 10^7$  (使用单倍体*Saccharomyces cerevisiae* 时)的酵母菌体\*<sup>1</sup>培养液分装至离心管中, 10,000 rpm、4℃离心2分钟。
  - \* 1: 请使用处于对数生长期的新鲜酵母菌体。
  - \* 1: 长时间培养的酵母菌体或冷冻保存的酵母菌体pellet也可以用于RNA的制备, 但RNA收量可能会降低。此外, 不同培养状态、冷冻状态和保存时间得到的RNA的纯度或品质有可能会下降。不推荐长时间冷冻保存。
  - \* 1: 使用冷冻的酵母菌体pellet时, 迅速按照以下方法5操作。
2. 使用移液器小心去除上清。
3. 在菌体沉淀中加入1 ml预冷的灭菌水, 吸打悬浮后, 10,000 rpm、4℃离心2分钟。
4. 使用移液器小心去除上清。
5. 加入80  $\mu$ l Yeast Processing Buffer, 使用移液器轻柔混匀。
6. 加入8  $\mu$ l Yeast Processing Enzyme Solution, 使用移液器轻柔混匀。
7. 30℃孵育30分钟~1 小时\*<sup>2</sup>, 并且每隔10~20分钟轻弹 (tapping) 反应管混合。
  - \* 2: 使用处于对数生长期的新鲜酵母菌体时, 37℃孵育10分钟即可制备得到RNA。但RNA的收量可能较低。
  - \* 2: 依酵母 (属)、培养条件、菌体数不同, 适宜反应时间也会有不同。建议预先确认适宜的处理时间。
  - \* 2: 使用冷冻的酵母菌体pellet时, 反应条件请使用30℃、10~30分钟。
8. 使用NucleoSpin RNA或RNAiso Plus, 对7.中得到的酵母菌体反应液制备total RNA。  
将NucleoSpin RNA或RNAiso Plus各说明书的一部分进行变更后使用。变更部分为本说明书的操作流程处带下划线的部分。操作方法的详细内容也可以参考各说明书的下述项。
  - NucleoSpin RNA: 5 Protocols、section 5.1 的step 2~9。
    - ※ DNase处理, 请使用NucleoSpin RNA中包含的Reaction Buffer for rDNase和rDNase, RNase-free (lyophilized)。
  - RNAiso Plus: 实验例及RNA提取的Flowchart
    - ※ 如需DNase I处理时, 请使用本制品中含有的RNase-free DNase I 和10X DNase I Buffer。

### RNA提取的相关试剂

请将本制品与NucleoSpin RNA或RNAiso Plus搭配使用。未确认与其他RNA提取试剂搭配使用的效果。

## ● 操作流程

### 与 NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250) 搭配使用时

请参照NucleoSpin RNA 操作说明书: 5 Protocols, section 5.1的step 2-9。

Protocol 变更的部分使用下划线表示。

前处理完成的酵母菌体反应液



← Buffer RA1 (已添加 1 M DTT 或 2-ME<sup>\*1</sup>) : 350 μl

\* 1: 使用前, 将所需量的Buffer RA1分装后每1 ml加入10 μl 2-巯基乙醇 (原液) 或20 μl 1 M DTT。

Vortex 2~3 分钟, 将Lysate加入到已安装在Collection Tube (2 ml) 上的NucleoSpin Filter (violet ring) 中。



11,000 × g, 离心1分钟

将 Lysate 回收至新的 1.5 ml 反应管中



← 70%乙醇: 350 μl

Vortex (15 秒以上), 轻微离心 (数秒)



Lysate 完成



吸打数次后, 将 Lysate 全量添加到 NucleoSpin RNA Column (light blue ring) 中, Column 需预先安装在 Collection Tube (2 ml) 上。

注: Lysate 体积超过 750 μl 时, 需要分两次进行离心操作。废弃各离心操作产生的滤液。(Lysate 中如果有凝聚物需要将凝聚物一起添加到 Column 中。)



11,000 × g, 离心 30 秒

更换 Collection Tube (2 ml)



← MDB: 350 μl



11,000 × g, 离心 1 分钟

← 将下述组成的 DNase 溶液 95 μl 添加到 Column 膜的中心。  
(必须使用 NucleoSpin RNA 附带的 rDNase 进行 DNase 处理)

Reaction Buffer for rDNase (90 μl)

Reconstituted rDNase<sup>\*2</sup> (10 μl)

\* 2: 请参照 NucleoSpin RNA 的说明书制备。

(接下页)

(接上页)

室温孵育 15 分钟



← 【1st wash】 Buffer RAW2: 200  $\mu$ l



11,000  $\times g$ , 离心 30 秒

更换 Collection Tube (2 ml)



← 【2nd wash】 Buffer RA3 (乙醇已添加) : 600  $\mu$ l



11,000  $\times g$ , 离心 30 秒

废弃 flow-through



← [3rd wash] Buffer RA3 (乙醇已添加) : 250  $\mu$ l



11,000  $\times g$ , 离心 2 分钟

Column 安装到 nuclease-free Collection Tube (1.5 ml) 上



← RNase-free H<sub>2</sub>O: 60  $\mu$ l



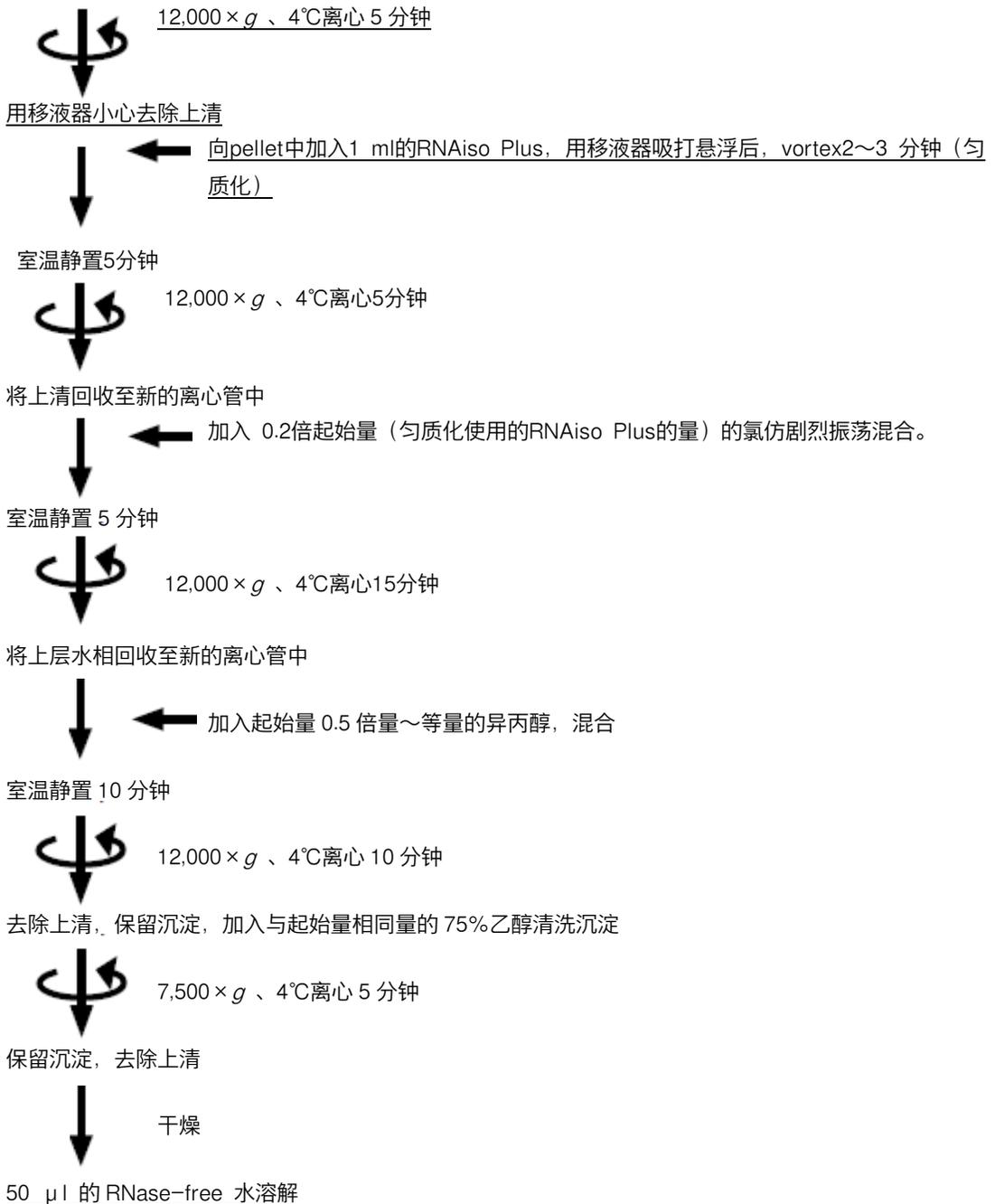
11,000  $\times g$ , 离心 1 分钟

total RNA 回收

## 与 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109) 搭配使用时

RNAiso Plus 说明书: 参照实验例和 RNA 提取的 Flowchat, 操作方法变更的部分使用下划线表示。

### 前处理完成的酵母菌体反应液



※ 需要进行DNase I 处理时, 使用本制品中的RNase-free DNase I 和10X DNase I Buffer处理DNase I, 操作方法请参考Appendix。

## ● 实验例

### 实验例1

以*Saccharomyces cerevisiae* (AH109株) 为样品进行total RNA的制备 (使用NucleoSpin RNA)

[方法]

过夜培养的*S. cerevisiae* (AH109株) 培养液 (YPD培养基, 1 ml) 按照使用kit protocol提取total RNA。

[结果]

吸光度260/280 nm的值大于2.0时, total RNA的纯度好。(表1, 图1)

表1. *S. cerevisiae* 为模板提取的 total RNA 的收量和纯度

使用试剂	酵母菌体数	收量 (μg)	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>
NucleoSpin RNA	$3.6 \times 10^7$	32.7	2.2



图1. *S. cerevisiae* (AH109株) 为样品进行total RNA的提取结果  
0.5 μg 电泳 (Lane 1)  
M: λ-Hind III digest 100 ng

### 实验例2

*S. cerevisiae* (AH109株) 为样品进行total RNA的提取 (使用RNAiso Plus )

[方法]

过夜培养*S. cerevisiae* (AH109株) 的培养液 (YPD培养基, 1 ml) 按照使用试剂操作方法提取total RNA。

[结果]

吸光度260/280 nm的值超过2.0时, total RNA的纯度好。(表2, 图2)

表2. *S. cerevisiae* 为模板提取total RNA 的收量和纯度

使用试剂	酵母菌体数	收量 (μg)	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>
RNAiso Plus	$4.8 \times 10^7$ 个	57.4	2.2



图2. *S. cerevisiae* (AH109株) 为样品进行total RNA的提取结果  
0.5 μg 电泳 (Lane 1)  
M: λ-EcoT14 I digest 100 ng

## ● Appendix

### 使用DNase I 去除基因组DNA

使用RNAiso Plus提取的total RNA，根据需要按照下述方法进行DNase I 处理。

#### 操作顺序

#### 1. 配制以下反应液。

试剂	使用量
total RNA	20~50 $\mu$ g
10X DNase I Buffer <sup>*1</sup>	5 $\mu$ l
RNase-free DNase I <sup>*1</sup>	2 $\mu$ l
RNase Inhibitor <sup>*2</sup>	20 U
RNase-free H <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l

\*1: 可以直接使用制品中添加的试剂，也可以使用Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A)。

\*2: 需要另外准备Recombinant RNase Inhibitor (Code No. 2313A)。

#### 2. 37°C 反应 20~30 分钟。

#### 3. 使用以下任意方法使DNase I 失活。

##### A. 热处理

(1) 加入0.5 M EDTA 2.5  $\mu$ l, 80°C加热处理2分钟。

(2) RNase-free水补足至100  $\mu$ l。

##### B. 苯酚 / 氯仿抽提

(1) 加入50  $\mu$ l的RNase-free水和100  $\mu$ l的苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 充分混合。

(2) 室温、12,000 rpm离心5分钟，上清转移至新的反应管中。

(3) 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1) 充分混合。

(4) 室温、12,000 rpm离心5 分钟，上清转移至新的反应管中。

#### 4. 加入10 $\mu$ l 3 M醋酸钠和250 $\mu$ l冷乙醇，混匀后 -80°C静置20分钟。

#### 5. 4°C、12,000 rpm离心10分钟，弃上清。

#### 6. 70%乙醇清洗沉淀，4°C、12,000 rpm离心5 分钟，弃上清。

#### 7. 干燥沉淀。

#### 8. 使用适量的RNase-free水溶解后，电泳确认基因组DNA去除效果，测定RNA浓度。(基因组DNA未被完全去除时，适当增加DNase I的添加量或延长反应时间再次消化。)

## ● Troubleshooting

#### 1. 提取的total RNA量少。

- 使用的酵母菌体量过多。

使用多于 $2\sim 5 \times 10^7$  (使用*Saccharomyces cerevisiae*时) 的酵母菌体时，Yeast Processing Enzyme Solution中含有的酶不能充分分解细胞壁，从而造成total RNA的提取量低。请使用适宜的酵母菌体量。依酵母 (属) 不同能够处理的适宜菌体数会有不同，此时请预先确认适宜处理的菌体数量。

- 使用的酵母菌体量过少。

使用明显少于 $2\sim 5 \times 10^7$  (使用*Saccharomyces cerevisiae*时) 的酵母菌体提取total RNA时，total RNA的收量和纯度会降低。为了能够以稳定的回收率回收total RNA，请使用上述记录的菌体量相近的菌体提取total RNA。依酵母 (属) 不同能够处理的适宜菌体数会有不同，此时请预先确认适宜处理的菌体数量。

- 所使用的酵母菌不适合使用该制品提取total RNA。

本制品使用Yeast Processing Enzyme Solution中含有的酶分解酵母细胞壁。因此，如果将该制品用于难于分解细胞壁的酵母菌时，total RNA的提取量会显著降低。

- total RNA的溶解不充分。

使用RNAiso Plus提取total RNA时，75%乙醇清洗后，如果过度干燥会使溶解变得困难。因此请注意不要加热干燥或长时间干燥。溶解困难时，可在60°C加热5分钟后于冰上放置数小时溶解。

## 2. 提取的total RNA有降解。

- 依据使用的酵母（属）或培养条件，使用样品的状态（处于对数生长期的新鲜酵母菌体、长时间培养的酵母菌体、冷冻保存的酵母菌体pellet等）不同前处理的适宜时间不同。此时需要预先优化处理时间。
- 以冷冻保存的酵母菌体pellet为样品进行提取时，由于冷冻状态和保存时间不同，可能对total RNA的质量及纯度产生影响。此时，请准备处于对数生长期的新鲜酵母菌体，不推荐长期冷冻保存的菌体。

## 3. 提取的total RNA 中混入基因组DNA。

使用NucleoSpin RNA提取total RNA时，必须使用NucleoSpin RNA中添加Reaction Buffer for rDNase和Reconstituted rDNase \*在Column上进行DNase I处理。（\* 参照NucleoSpin RNA的说明书进行操作。）但是，即使是在Column上进行DNase I 处理，由于被处理的酵母（属）或培养条件，或被处理的酵母菌体是否过量及水相回收的情况等不同，可能依然会有基因组DNA混入。此种情况，请根据需要进行DNase I处理，操作方法请参照Appendix。

## 4. 其他问题可以参考NucleoSpin RNA或RNAiso Plus操作说明书中的Troubleshooting部分。

## ● 关联产品

NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

*Oligotex-dT30* <Super> mRNA Purification Kit (From Total RNA) (Code No. 9086)

Dr. GenTLE™ (from Yeast) High Recovery (Code No. 9082)

Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A/B)

Recombinant RNase Inhibitor (Code No. 2313A/B)

Dr. GenTLE is trademark of Takara Bio Inc.

### 注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站[www.takarabio.com](http://www.takarabio.com)。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>