

ISOGEN、ISOGEN-LS

RNA 提取试剂

使用 ISOGEN / ISOGEN-LS 从酵母提取 RNA

酵母的细胞壁较厚，仅仅进行普通的 ISOGEN/ISOGEN-LS 处理，难以回收 RNA。因此，使用作用于 β -1,3 键葡萄糖聚合物的 Zymolyase 对细胞壁进行溶解，提取 RNA。对比有经过 Zymolyase 处理及没有经过 Zymolyase 处理，验证其效果。

操作流程

yeast (1.5ml culture)

↓ 离心 (5k x g、4°C、5 分钟)

沉淀

↓ ←TE 1 ml

↓ Vortex

↓ 离心 (5k x g、4°C、5 分钟)

沉淀

↓ ←Buffer A^{*1} 200 μ l

↓ Vortex

↓ ←Zymolyase-20T (1,000U/Buffer A 1 ml) 20 μ l

进行 Zymolyase 处理对照试验时，黄色部分步骤省略。

↓ 孵化 (30°C、30 分钟)

↓ 离心 (5k x g、4°C、10 分钟) * 使用 ISOGEN-LS 时无需此步骤

沉淀 *使用 ISOGEN-LS 时无需此步骤

↓ ←往沉淀里添加 1 ml 的 ISOGEN 或往 220 μ l 的溶液里添加 750 μ l 的 ISOGEN-LS

↓ 放置 (室温、5 分钟)

↓ ←Chloroform 200 μ l

↓ 用力地搅拌 (15 秒)

↓ 放置 (室温、3 分钟)

↓ 离心 (12k x g、4°C、15 分钟)

水层 (500 μ l)

↓ ←Isopropanol 500 μ l

- ↓ 放置（室温、5-10 分钟）
- ↓ 离心（12k x g、4°C、10 分钟）

沉淀

- ↓ ←70% Ethanol 1 ml
- ↓ Vortex
- ↓ 离心（7.5k x g、4°C、5 分钟）

沉淀

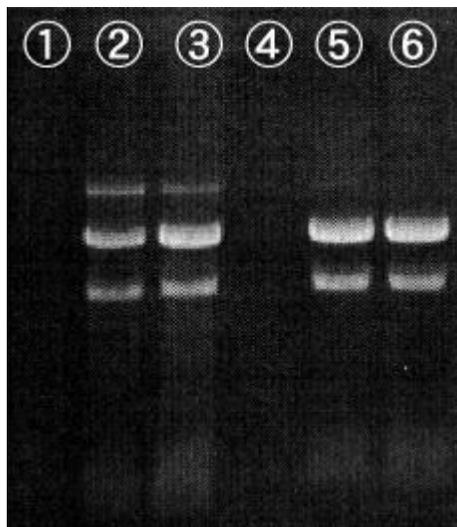
- ↓ 干燥
- ↓ ←溶于 TE 100 μl

Total RNA 溶液

*1 Buffer A : 1M sorbitol, 100mM EDTA, 14mM 2-Mercaptoethanol

结果

上述操作中提取到 Total RNA 电泳结果如下。



1% 福尔马林变性琼脂糖凝胶
100V、40 分钟电泳

道	细菌名称	Zymolyase 处理	提取试剂	OD260/280	RNA 浓度 (mg/ml)
Lane ①	<i>S. cerevisiae</i>	无	ISOGEN	1	0.12
Lane ②		有	ISOGEN	1.7	1.8

Lane ③			ISOGEN-LS	1.8	2.8
Lane ④	<i>S. pombe</i>	无	ISOGEN	1.1	0.1
Lane ⑤		有	ISOGEN	1.8	2.1
Lane ⑥			ISOGEN-LS	1.8	2.1