

通用性植物样本RNA快速提取试剂盒

KR010 50次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次
裂解液 RLT	室温	50 ml
裂解液 CLB (赠送)	室温	8 ml
裂解液 RLT Plus	室温	25 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
PLANTaid	室温	5 ml
基因组 DNA 清除柱 和收集管	室温	50 套
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 低温 (4°C或者 - 20°C) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果, 运输和储存均在室温下 (15°C - 25°C) 进行。
2. 试剂长时间暴露于空气中会产生挥发、氧化、PH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚, 氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 简捷, 单个样品操作一般可在 25 分钟内完成, 世界上最简单快速的试剂盒。
3. 独有的植物 RNA 助提剂 PlantAid 可以有效结合多糖多酚, 提高清除效果。
4. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留, 得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化。

5. 多次柱漂洗确保高纯度, OD260/OD280 典型的比值高达 2.1 ~ 2.2, 无 DNA 残留, 可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

注意事项

1. 实验前请仔细阅读补充说明, 确定是否需要略去基因组 DNA 清除柱子步骤和是否使用裂解液 CLB。
2. 所有的离心步骤均可在室温完成 (4°C离心也可以), 使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机。
3. 需要自备乙醇, 研钵(可选)。
4. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 处理能力, 否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时, 如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时可使用较少的样品处理量, 将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
5. 裂解液 RLT 和 RLTplus 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物, 操作时戴乳胶手套, 避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 要用大量清水或者生理盐水冲洗。

6. 关于 DNA 的微量残留:

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留 (DNase 消化也无法做到 100% 无残留), 本公司的 RNA 提取产品, 采取了独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术, 绝大多数 DNA 已经被清除, 不需要 DNase 消化, 可直接用于反转录 PCR 和荧光定量 PCR。个别特殊情况如 DNA 含量过于丰富造成残留或者要进行严格的 mRNA 表达量分析荧光定量 PCR, 我们建议在进行模板和引物的选择时:

- 1) 选用跨内含子的引物, 以穿过 mRNA 中的连接区, 这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
- 2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
- 3) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理。
- 4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前, 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 柱上消化处理。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量无水乙醇!

1. 直接研磨法 (提取简单植物样品推荐此法, 但是简单样品也可以用液氮研磨法):

a. 新鲜植物组织称重后取 100mg-200mg 迅速剪成小块放入研钵 (冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 100mg-200mg 放入研钵), 加入 **10 体积 (1ml)** RLT 和 **1 体积 (100μl)** PLANTaid **室温下充分研磨**

成匀浆, 注意应该迅速研磨让组织和裂解液 RLT 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

注: PLANTaid 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富的困难样品不可缺少成分。

b. 将裂解物转入离心管, 剧烈摇晃振荡 15 秒, 13,000 rpm 离心 5-10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTaid。

c. 取 **480 μ l 裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量)** 转到一个新离心管 (RNA free)。加入上清体积一半的无水乙醇(**0.5 体积**), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

d. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

2. 液氮研磨法 (提取复杂, 易降解样品时推荐此法) :

a. 取 500 μ l 裂解液 RLT, 转入 1.5ml 离心管中, 加入 50 μ l PLANTaid 混匀备用。

b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后, 取 50mg-100mg 细粉转入上述装有 RLT 和 PLANTaid 的离心管, 立即用手剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。

c. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。

d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 5-10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTaid。

e. **取裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量)** 转到一个新离心管 (RNA free)。加入上清体积一半的无水乙醇(**0.5 体积**), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

f. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

注意: 以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理, 可以提高产量。也就是使用 1ml 的裂解液 RLT 和 100 μ l PLANTaid 和 100mg-200mg 的样品。

3. 将混合物(每次小于 720 μ l, 多可以分两次加入一个基因组清除柱中, (清除柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。

确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。

4. 将基因组 DNA 清除柱子放在一个干净 2ml 离心管内 (RNA free), 在基因组清除柱内加 500 μ l 裂解液 RLT Plus, 13,000 rpm 离心 30 秒, 收集滤液 (RNA 在滤液中), 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (通常为 450-500 μ l 左右, 滤过时候损失体积应该减去), 加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程,立即吹打混匀,不要离心。
5. 立刻将混合物(每次小于 720 μ l, 分两次加入吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。

确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。

6. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 1 分钟, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
7. 加入 500 μ l 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 13,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
8. 重复步骤 7 一次。
9. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 除去漂洗液中残留乙醇以免抑制下游反应。
10. 取出吸附柱 RA, 放入一个 RNase free 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l RNase free water (事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量), 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。
11. 如果预期 RNA 产量 > 30 μ g, 加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 9, 合并两次洗液, 或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高,分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%,但是浓度要低,用户根据需要选择。

补充说明

1: 植物种类非常复杂, 不同的植物种类和部位的样品使用本试剂盒效果不同。部分的样品在经过基因组 DNA 清除柱时会严重降低产量, 建议尝试略去基因组 DNA 清除柱子的步骤, 提高产量。

关于是否基因组DNA清除柱子的步骤的使用:

- 1) 普通RT-PCR: 可以省略基因组DNA清除柱子的步骤。
- 2) 荧光定量RT-qPCR:

反转录试剂盒有去除基因组的, 可以省略基因组DNA清除柱子的步骤。

反转录试剂盒没有去除基因组的, 必须做基因组DNA清除柱子的步骤。

高通量测序/转录组测序: 要求特别高的下游实验必须做基因组DNA清除柱子的步骤。

2: 略去基因组 DNA 清除柱子步骤就是省略了步骤 3 和 4, 在步骤 1 和 2 后直接接步骤 5。

3: 关于特别复杂难提取植物样品提取失败或者产量低的情况:

一些特别复杂的植物样品提取, 如水稻种子, 葡萄果实, 蓝靛果果实, 百合鳞茎, 土豆块茎等, 裂解液 RLT 无法提取, 需选择多糖多酚/复杂植物 RNA 提取试剂盒。多糖多酚/复杂植物 RNA 提取试剂盒采用强力裂解液 CLB 选项, 本试剂盒目前赠送 8ml 强力裂解液 CLB, 您可以测试(裂解液 CLB)提取您样品的效果。

4: 植物 RNA 快速提取试剂盒使用新裂解液 CLB 操作步骤

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量无水乙醇!

⇒ 取 1ml 裂解液 CLB 至离心管内(如果 CLB 有析出或者沉淀需先置于 65°C 水浴重新溶解), 在裂解液 CLB 中加入 5% β -巯基乙醇 (1ml CLB 加 50 μ l β -巯基乙醇)。颠倒混匀后 65°C 水浴中预热。

1) 液氮中研磨新鲜或-70°C 冷冻的材料至细粉。

2) 转移 100mg-200mg 细粉 (水分少的样品如种子叶片等可加 100mg-150mg, 水分多的样品如西瓜多加一些) 加至预热的裂解液 CLB (已加有 β -巯基乙醇) 离心管中, 立即激烈涡旋 30 - 60 秒或者用吸头吹打混匀裂解, 短时放回 65°C 水浴中 (5 min-10 min, 时间稍长一点 10 分钟产量可能提高一些), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。

β -巯基乙醇是裂解液 CLB 的关键成分, 必要的时候可以提高终浓度到 10-20%。

3) 振荡混匀后室温 13,000rpm 离心 10 分钟。

4) 取裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。若上清表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面液体即可。

立刻接操作步骤的步骤 3。