

# 多糖多酚复杂植物RNA快速提取试剂盒

## KR011 50次

### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50次
裂解液 CLB	室温	50 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 <sub>2</sub> O	室温	10 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. 环境温度低时溶液可能形成沉淀, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 低温 (4°C 或者 -20°C) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果。因此运输和储存均在室温下进行。
3. 试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

### 产品介绍:

试剂盒采用新型基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留, 独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 离心沉淀去除多糖多酚和次级代谢产物, 然后裂解混合物用乙醇调节 RNA 结合吸附到基因组 DNA 清除柱, 然后 RNA 被选择性洗脱滤过, 吸附在基因组 DNA 清除柱上的残留 DNA 无法洗脱连同柱子一起丢弃从而清除掉 DNA。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后, RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅

基质膜, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物, 蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase free H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

## 产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚, 氯仿, Beta 巯基乙醇等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速, 简捷, 单个细胞样品操作一般可在 25 分钟内完成。
3. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术确保有效清除 gDNA 残留, 得到的 RNA 不需要 DNase 消化, 可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 提取 RNA 可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准。基本无 DNA 残留, 可用于 RT-PCR, Northern-blot, 二代测序和各种实验。

## 注意事项

1. 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到13,000 rpm的台式离心机即可。
2. 需要自备β-巯基乙醇, 乙醇, 研钵(可选)。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱DA和和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。
4. 裂解液CLB和RLT Plus 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。
5. 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 EASYspin Plus RNA 提取产品, 由于采取了本公司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

## 操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

**提示:** 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中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%  $\beta$ -巯基乙醇 (1ml CLB 加 50 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇)。颠倒混匀后 65°C 水浴中预热。多个样品按照比例放大准备。

### 1. 直接研磨法 (实验室无液氮情况下或者柔软易研磨植物样品推荐此法):

- a. 新鲜植物组织或者冰冻保存样品称重后取 100mg-200mg (水分少的样品如叶片种子等可加 100mg-150mg, 水分多的样品如草莓西瓜果实可多加一些) 迅速剪成小块放入研钵, 加入 **1ml CLB** (已加有 $\beta$ -巯基乙醇) **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 CLB 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。 **$\beta$ -巯基乙醇是裂解液 CLB 的关键成分, 必要的时候可以提提高终浓度到 10-20%。如果特别复杂植物, 可以尝试在裂解液中加入 PVP40 至终浓度 2%。**
- b. 将裂解物转入离心管, 立即剧烈振荡 15 秒, 短时放回 65°C 水浴中 (5-10 min), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。13, 000rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。
- c. **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。**
- d. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

### 2. 液氮研磨法 (适用广泛, 提取复杂难破碎, 易降解样品时推荐此法):

- a. 液氮中研磨新鲜或-70°C 冷冻的材料至细粉。
- b. 转移 100mg-200mg 细粉 (水分少的样品如叶片种子等可加 100mg-150mg, 水分多的样品如草莓西瓜

果实可多加一些) 加至预热的裂解液 CLB (已加有 $\beta$ -巯基乙醇) 离心管中。立即剧烈涡旋 30-60 秒或者用吸头吹打混匀裂解直得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。

- c. 短时放回 65°C 水浴中 (5-10 min), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。
- d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。
- 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。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。**

f. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

3. 将混合物(每次小于 720 $\mu$ l, 可以分两次加入)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(分 2 次), 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 (RNAse free ), 在基因组清除柱内加 500 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l, 多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 2 分钟(分 2 次), 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。加入 500 $\mu$ l 漂洗液 RW, 重复一遍。

8. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

9. 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 $\mu$ l RNase free water (事先在 70-90°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。
10. 如果预期 RNA 产量 > 30 $\mu$ g, 加 30-50 $\mu$ 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。**

#### **附录 1: RNA 含量少样品或者 RNA 复杂产量低的解决方案**

可以提高样品处理量到 300-500mg/2ml 裂解液 CLB, 上清过两根基因组 DNA 清除柱子, 洗脱下来的 RNA, 可以两个合并到一根 RNA 吸附柱上, 可以大大提高 RNA 浓度。