

SteadyPure植物RNA提取试剂盒

Code No. AG21019

SteadyPure Plant RNA Extraction Kit

包装量: 50 rxns
保存温度: Package 2-1 -20°C
Package 2-2 室温(15-25°C)

产品概述

本制品可从50 ~ 100 mg 各种植物（简单植物和富含多糖多酚、富含淀粉、富含油脂等复杂植物）的组织材料（根、茎、叶、花、果实、种子）及真菌等样本中提取获得总RNA。试剂盒采用独特的裂解系统，无需有毒的酚氯仿抽提，能在迅速裂解组织的同时抑制细胞释放出的核酸酶，保持RNA的完整性，同时创造适宜的条件利于RNA吸附到硅胶膜上。利用DNase I去除残留的基因组DNA，再通过两种不同的缓冲液洗涤去除盐、蛋白质和大分子等杂质，最后用RNase Free Water洗脱，得到高纯度、高收量的RNA。

本制品包含两种不同的裂解体系：简单植物裂解体系和复杂植物裂解体系。简单植物裂解体系提供的裂解液Buffer RLS主要成分为异硫氰酸胍，适用于大多数植物组织的裂解。由于某些植物次级代谢产物较特殊，异硫氰酸胍易使样品产生沉淀，导致RNA提取效果不佳，此时可以尝试使用复杂植物裂解体系，复杂植物裂解体系是在裂解液Buffer PPS和Buffer PA-2的作用下去除多糖多酚、淀粉、油脂等复杂成分，再通过Buffer RLS裂解植物组织。使用本产品获得的RNA纯度高，蛋白质、基因组DNA和其他杂质的污染少，可以直接用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、构建cDNA文库、Northern杂交、斑点杂交、Poly A筛选、体外翻译、RNA分解酶的保护分析、分子克隆、芯片分析等各种分子生物学实验。

安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂，实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套，然后再进行实验操作。

注意：使用后溶液需要收集在废液桶中专门处理。

如果缓冲液不小心溅出，请立刻用大量清水冲洗，然后用浓度为1%的次氯酸钠溶液清洗。

详细信息请参考相关MSDS信息。

产品组成

50 × DTT Solution*1	700 μl
DNase I (RNase free) *1	200 μl
10X DNase I Buffer*1	1 ml
Buffer PPS	25 ml
Buffer PA-2	1.5 ml X 2
Buffer RLS	15 ml X 2
Buffer RWA	30 ml
Buffer RWB*2	30 ml
RNase Free Water*3	13 ml
Plant RNA Mini Columns	50 sets
Collection tubes	50 pcs
RNase Free Tubes*4	50 pcs

*1 此三种组分包装于Package 2-1中，需放置于-20°C保存；其余组分均包装于Package 2-2中，室温(15-25°C)保存。

*2 Buffer RWB 在首次使用前，请添加70 ml的100%乙醇（Buffer RWB与无水乙醇体积比为3:7），混合均匀后在瓶子上做好标记，室温保存。

*3 开启后建议保存于-20°C。

*4 此组分仅用于洗脱RNA，前期裂解所用离心管需自备。



➤ 实验前准备

1. 自备：无水乙醇、1.5 ml 离心管(RNase free)、2.0 ml 离心管(RNase free)。
2. Buffer PPS 若出现沉淀，请于37℃加热溶解，Buffer RLS 若出现沉淀，请于60℃加热溶解，待溶液恢复至室温后使用。
3. Buffer RWB 在首次使用前，请添加70 ml的 100% 乙醇（Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7），混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。
4. Buffer RLS 使用前需加入 50 × DTT Solution，至终浓度为1 × DTT Solution，即每1 ml 的Buffer RLS 中加入 20 μl 的50 × DTT Solution。此裂解Buffer 最好现用现配。加入50 × DTT Solution 的Buffer RLS 可在室温放置 1 个月。

➤ 保存及运输

保存温度：Package 2-1 -20℃ 保存；
Package 2-2 室温（15-25℃）保存。

运输温度：Package 2-1 干冰或-20℃冰袋运输；
Package 2-2 室温运输。

➤ 注意事项

1. 应尽量使用新鲜的实验材料，以确保提取的 RNA 不被降解。
2. 使用液氮研磨组织材料时，应随时加入液氮，以确保提取的 RNA 不被降解。
3. 使用单个纯化柱纯化时，组织材料切勿超过最大起始量，且要充分裂解，否则会堵塞Mini Column，影响RNA收量及纯度。如果样本量较大，请适当增加试剂用量或使用多个 Mini Columns 进行纯化操作。
4. *Plant RNA* Mini Column 的最大容积为700 μl，使用时如果液体的体积超出最大容积，请分批加入。
5. 实验过程中应竖直将吸附柱取出，避免吸附柱柱头触碰收集管壁。
6. 对于不确定简单或复杂的样本可先用简单植物裂解体系提取，如果提取效果不佳再尝试使用复杂植物裂解体系进行提取。
7. 若不进行“DNase I消化”的步骤，提取得到的RNA中可能会存在基因组DNA的残留。
8. 操作过程中，应预防RNase污染，需注意以下几方面：
 - a) 使用 RNA 操作专用实验台，经常更换新手套，穿戴RNA专用实验服，实验过程中尽量不要说话及来回走动，操作过程中避免物品从离心管上方经过。
 - b) 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的RNase污染。

操作流程

样品的裂解

简单植物组织的裂解：

1. 将新鲜或 -80°C 冻存的植物组织样品转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨植物组织（研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮），直至研磨成粉末状（无明显可见颗粒，研磨不充分会影响 RNA 的收量）。
2. 将 50 ~ 100 mg 已研磨成粉末状的样本转移至含有 500 μl 裂解液 Buffer RLS（在使用前确认 Buffer RLS 中已加入 50 $\times$ DTT Solution）的 1.5 ml 离心管（RNase free）中，立即高速涡旋混匀或用移液枪反复吹打至样本充分裂解（无明显沉淀）。（注：针对柔软易裂解的组织样本，可以使用低温匀浆器加入适量 Buffer RLS 进行匀浆裂解。）
3. 将上述裂解液室温静置 2 分钟后 12,000 rpm 4°C 离心 5 分钟。
4. 小心吸取上清液至新的 1.5 ml 离心管（RNase free）。



样本的裂解处理

复杂植物组织的裂解：

1. 将新鲜或 -80°C 冻存的植物组织样品转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨植物组织（研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮），直至研磨成粉末状（无明显可见颗粒，研磨不充分会影响 RNA 的收量）。
2. 将 50 ~ 100 mg 已研磨成粉末状的样本转移至含有 500 μl 裂解液 Buffer PPS 的 1.5 ml 离心管（RNase free）中，立即高速涡旋混匀或用移液枪反复吹打至样本无明显沉淀。
3. 将上述裂解液 12,000 rpm， 4°C 离心 5 分钟。转移上清液至新的 1.5 ml 离心管（RNase free）中。加入上清液 1/10 体积的 Buffer PA-2（此时会出现沉淀），涡旋振荡混匀 10 次（约 15 秒）。再 12,000 rpm， 4°C 离心 5 分钟。
4. 将上清液转移至新的 2.0 ml 离心管（RNase free）中。加入 500 μl 裂解液 Buffer RLS（在使用前确认 Buffer RLS 中已加入 50 $\times$ DTT Solution），立即高速涡旋混匀或用移液枪反复吹打至样本充分裂解（无明显沉淀）。

纯化步骤：

1. 向上述裂解液中加入 1/2 体积的无水乙醇，用移液枪吹打混匀，若出现明显粘稠物或沉淀，用移液枪吹打多次，打散沉淀。（注：若沉淀不打散后续会导致 *Plant RNA* Mini Column 堵塞，影响收量及纯度。）
2. 将上述混合液和沉淀全部转移至 *Plant RNA* Mini Column 中，12,000 rpm 室温离心 2 分钟，弃滤液。（如果混合液的体积大于 700 μl ，请分批加入。）
3. 向 *Plant RNA* Mini Column 中加入 600 μl 的 Buffer RWA，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
4. 向 *Plant RNA* Mini Column 中加入 750 μl 的 Buffer RWB，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。（注：请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100% 乙醇。）

*Plant RNA* Mini Column 吸附 RNA
600 μl Buffer RWA 洗 1 次
750 μl Buffer RWB 洗 1 次

5. DNase I 消化（可选择）：

- ① 按下表配制 DNase I 反应液并混匀。把 50 μl DNase I 反应液加到 *Plant RNA* Mini Column 的膜中央，室温静置 15 分钟。

组分	用量
DNase I (RNase free)	4 μl
10 $\times$ DNase I Buffer	5 μl
RNase free water	41 μl

DNase I 消化 15 分钟
350 μl Buffer RWB 洗 1 次
(可选择)

- ② 向上述 *Plant RNA* Mini Column 膜中央加入 350 μl Buffer RWB，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。

6. 向 *Plant RNA* Mini Column 中加入 750 μl 的 Buffer RWB，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
7. 将 *Plant RNA* Mini Column 的吸附柱安置于新的 2.0 ml Collection Tube 上，12,000 rpm 室温离心 2 分钟。（注：安装于新的 2.0 ml Collection Tube 有利于提高 RNA 纯度。）
8. 将 *Plant RNA* Mini Column 的吸附柱安置于新的 RNase Free Tube 上，在吸附柱膜的中央处加入 50 μl RNase Free Water，室温静置 5 分钟，然后 12,000 rpm 室温离心 2 分钟洗脱得到 RNA，可用于后续实验。若不立即进行后续实验可将溶解后的 RNA 放入 -80°C 中保存。

750 μl Buffer RWB 洗 1 次
空管离心 2 分钟50 μl RNase Free Water 洗脱

