

版本号: DP140916

# RNAprep Pure Plant Kit (Polysaccharides&Polyphenolics-rich)

## RNAprep Pure 多糖多酚植物总RNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP441

### 产品内容

产品组成	DP441 (50 preps)
裂解液SL (Buffer SL)	30 ml
去蛋白液RW1 (Buffer RW1)	40 ml
漂洗液RW (Buffer RW)	12 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O (瓶装)	15 ml
RNase-Free吸附柱CR3 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR3 in a 2 ml Collection Tube)	50 套
RNase-Free过滤柱CS (含2 ml收集管) (RNase-Free Filtration Column CS in a 2 ml Collection Tube)	50 套
DNase I(1500 U)	1 支
缓冲液RDD (Buffer RDD)	4 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O (管装)	1 ml
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5 ml)	50 个

### 储存条件

RNase-Free DNase I, 缓冲液RDD和RNase-Free ddH<sub>2</sub>O(管装)置于2-8℃保存; 加入β-巯基乙醇的裂解液SL 4℃可放置一个月; 其他试剂室温(15-25℃)保存。

---

## 产品简介

本试剂盒可从植物组织，特别是富含多糖多酚或淀粉的植物组织（如棉花叶片，成熟水稻叶片，拟南芥种子，白松松针，香蕉，枇杷叶片，马铃薯块茎，苹果，梨，西瓜果肉，猕猴桃，月季，烟草，沙棘，百合等）中快速提取总RNA，可同时处理大量不同样品。提取的总RNA纯度高，没有基因组、蛋白和其它杂质的污染，可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

## 预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在裂解液SL中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。
4. 配制溶液应使用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O。(将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(V/V)，混匀后放置过夜，高压灭菌。)

## RNA得率

植物样本(100 mg)	总RNA量(µg)
棉花叶片	~25
拟南芥种子	~40
香蕉果肉	~5

## 使用前注意事项

- 1 操作前在SL中加入β-巯基乙醇至终浓度5%，如475 µl SL中加入25 µl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的SL 4℃可放置一个月，裂解液SL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
  - 2 植物组织裂解是否充分直接影响到RNA提取的质量和产量，本试剂盒中提供的裂解液SL，适用于大多数植物组织的裂解，但有些植物组织（例如玉米的乳白色胚乳，红豆种子或小麦种子）或丝状真菌，由于次级代谢产物较特殊，异硫氰酸胍使样品产生沉淀，导致RNA提取效果不佳的现象，此时可以向TIANGEN公司免费索取另一种裂解液HL，将解决该问题。
  - 3 第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
-

---

## DNase I储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550  $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。

**注意：**从-20 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。

### 操作步骤

以下所有离心步骤均在室温下进行。

#### 1. 匀浆处理:

50-100 mg植物叶片或果实果肉在液氮中迅速研磨成粉末，加入500  $\mu$ l SL（使用前请先检查是否已加入 $\beta$ -巯基乙醇），立即涡旋剧烈震荡混匀。

**注意1：**对于预期RNA得率小于10  $\mu$ g的植物样本，请使用100 mg的起始样本量；对于富含淀粉的样本或成熟叶片，请将裂解液SL用量增加至700  $\mu$ l。

**注意2：**由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的RNA含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

#### 2. 12,000 rpm(~13,400 $\times$ g) 离心2 min。

3. 将上清液转移至过滤柱CS上(过滤柱CS放在收集管中)，12,000 rpm(~13,400  $\times$ g) 离心2 min，小心吸取收集管中的上清至新的RNase-Free的离心管中，吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。

4. 缓慢加入0.4倍上清体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中，12,000 rpm(~13,400  $\times$ g)离心15 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

**注意：**如果上清液体积有损失，请相应调整乙醇的加量。

5. 向吸附柱CR3中加入350  $\mu$ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400  $\times$ g)离心15 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

6. DNase I工作液的配制：取10  $\mu$ l DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70  $\mu$ l RDD溶液，轻柔混匀。

7. 向吸附柱CR3中央加入80  $\mu$ l的DNase I工作液，室温放置15 min。

8. 向吸附柱CR3中加入350  $\mu$ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400  $\times$ g)离心15 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

---

---

9. 向吸附柱CR3中加入500  $\mu\text{l}$ 漂洗液RW (使用前请先检查是否已加入乙醇)，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心15 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

10. 重复步骤9。

11. 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min，将吸附柱CR3放入一个新的RNase-Free离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30-50  $\mu\text{l}$  RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，室温放置2 min，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心1 min，得到RNA溶液。

**注意：**洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu\text{l}$ ，体积过小影响回收效率。RNA样品请在-70  $^{\circ}\text{C}$ 中保存。如果预期RNA得率大于30  $\mu\text{g}$ ，可将步骤11中离心得到的RNA溶液再加入吸附柱CR3中，室温放置2 min，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心1 min，得到RNA溶液。

## RNA纯度及浓度检测

**完整性：** RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件：胶浓度1.2%；0.5 $\times$ TBE电泳缓冲液；150V，15 min)检测完整性。由于细胞中70-80%的RNA为rRNA，电泳后UV下应能看到非常明显的rRNA条带。rRNA大小分别约为5 kb和2 kb，分别相当于28S和18S rRNA；植物叶片中由于含有大量的叶绿体RNA，可见4条或更多 rRNA。植物RNA样品中最大rRNA亮度应为次大rRNA亮度的1.5-2.0倍，否则表示RNA样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

**纯度：** OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>读数在1.8-2.1之间，比值为2.0是高质量RNA的标志。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>读数受测定所用溶液的pH值影响。同一个RNA样品，假定在10 mM Tris，pH7.5溶液中测出的OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>读数1.8-2.1之间，在水溶液中所测读数则可能在1.5-1.9之间，但这并不表示RNA不纯。

**浓度：** 取一定量的 RNA 提取物，用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O稀释n 倍，用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O将分光光度计调零，取稀释液进行OD<sub>260</sub>，OD<sub>280</sub>测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times (\text{稀释倍数}n) \times 40$$

---