



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ HiFi 大量植物RNA快速提取试剂盒
- ◆ 目录号 1137
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

HiFi 大量植物 RNA 快速提取试剂盒

目录号: 1137

| 目录编号 | 包装单位 |
|--------|------|
| 113701 | 10次 |

❖ **适用范围:**

适用于快速大量提取植物组织细胞总RNA

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

| 试剂盒组成 | 保存 | 10 次 |
|-----------------------------|------------------|------------------------------|
| 裂解液 RLT | 室温 | 100 ml |
| 去蛋白液 RW1 | 室温 | 120 ml |
| 漂洗液 RW | 室温 | 25 ml X 2 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 | 室温运输， 4° C 保存 | 10 ml X 2 |
| RNase-free 吸附柱 RA 和收集管 | 室温 | 10 套 |

本试剂盒在室温储存 6 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温 (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 (15°C - 25°C) 进行。
3. 避免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:**

独特的裂解液/ β -巯基乙醇迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 植物 RNA 助提剂 PLANTaid 帮助结合多糖多酚并通过离心去除, 然后用乙醇调节结合条件后, RNA 在高离子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 H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ **产品特点:**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚, 氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 60 分钟内完成。
4. 独有的植物 RNA 助提剂可以有效结合多糖多酚, 提高清除效果。
5. 多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.9~2.0, 基本无 DNA 残留, 可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

❖ **注意事项：**

1. 所有的离心步骤均可在室温完成，使用可容纳50ml 离心管的离心机。
2. 需要自备乙醇， β -巯基乙醇，一次性注射器（可选），研钵。
3. 裂解液RLT 和去蛋白液RW1中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**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。**
4. 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RLT，主要成分为异硫氰酸胍，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）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固化，导致RNA 无法提取，此时可以向我们索取另一种裂解液RLC，将解决该问题。
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,本公司的 HiFi 系列 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留（一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见）影响不是很大，如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 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。本试剂盒还可以用于DNase I处理后的RNA清洁(cleanup),请联系我们索取具体操作说明书。

4) 在步骤去蛋白液RW1漂洗前，直接在吸附柱RA上进行DNase I处理。请联系我们索取具体操作说明书。

6. 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×TBE 电泳缓冲液; 150v, 15 分钟)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。动物rRNA 大小分别约为 5 kb 和 2kb, 分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍, 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: OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA, OD260/OD280 读数 (10mMTris, pH7.5) 在 1.8-2.1 之间。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品, 假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280 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 水稀释 n 倍, 用 RNase-free 水将分光光度计调零, 取稀释液进行 OD260, OD280 测定, 按照以下公式进行 RNA 浓度的计算: 终浓度 (ng/μl) = (OD260)×稀释倍数 n)×40

❖ **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 瓶加入指定量无水乙醇！
- ⇒ 操作前在裂解液 RLT 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml RLT 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT 4 $^{\circ}$ C 可放置一个月。

1. 直接研磨法（推荐）：

a. 新鲜植物组织称重后取 1-2g 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 1-2g 放入研钵），加入 **10 体积（10ml）RLT**（请确定已加入 β -巯基乙醇）和 **1 体积（1ml）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 是提取多糖多酚含量丰富的困难样品不可缺少成分。提取普通植物组织可以不加 PLANTaid，RNA 产量可能会提高一些。

b. 将裂解物转入离心管，剧烈摇晃振荡 15 秒，10,000-13,000x g 离心 10 分钟（如果离心机转速低，可适当延长离心时间），沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTaid，小心取裂解物上清（需计算体积）转到一个新离心管。

c. 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，立即剧烈振荡混匀，不要离心。

d. 立刻接**操作步骤**项下 3。

2. 液氮研磨法：

a. 取 10ml 裂解液 RLT（已经加入 β -巯基乙醇），转入 50ml 离心管中，加入 1ml PLANTaid 混匀备用。

b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后，取 1-2g 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。

在 56 $^{\circ}$ C 温育 1-3 分钟有助于裂解植物，但是淀粉含量高的植物不能温育，因为提高

的温度可能导致淀粉膨胀。

- c. 用带钝针头的一次性 5ml(配0.9mm 针头) 注射器抽打裂解物 10 次或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 10,000-13,000x g 离心 10 分钟,沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTaid, 将所有裂解物上清转到一个新离心管。
 - e. 较精确估计裂解物(上清)体积, 加入 **0.5 体积**的无水乙醇,此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程, 立即剧烈振荡混匀, 不要离心。
 - f. 立刻接**操作步骤**项下 3。
3. 将混合物加入一个吸附柱 RA 中,(吸附柱放入收集管中) 10,000-13,000x g 离心 5 分钟(确保全部通过,膜上无残留液体,否则应加大转速和时间),弃掉废液。
 4. 加 6ml 去蛋白液 RW1, 室温放置 1 分钟, 12,000x g 离心 3 分钟, 弃掉废液。
 5. 加入 10ml 漂洗液 RW (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 10,000-13,000x g 离心 1-2 分钟, 弃掉废液。加入 10ml 漂洗液 RW, 重复一遍。
 6. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000x g 离心 5 分钟以干燥膜基质残留乙醇,用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇, 室温或者烘箱晾干几分钟。
 7. 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 500 μ l -1ml RNase free **H₂O** (事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 3 分钟, 12,000x g 离心 2 分钟。
 8. 如果预期 RNA 产量>0.6mg, 加 300-500 μ l RNase free **H₂O** 重复步骤 7, 合并两次洗脱液, 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。