



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 Ex 植物RNA提取试剂盒
 - ◆ 目录号 1138
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

HiFi Ex 植物 RNA 快速提取试剂盒

目录号: 1138

❖ 适用范围:

适用于快速提取植物组织细胞总RNA, 使用独有基因组DNA清除柱技术可有效清除电泳可见gDNA残留, RNA可用于反转录PCR, 荧光定量PCR等。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	20 次(113801)	50 次(113802)
裂解液 RLT	室温	20 ml	50 ml
裂解液 CLB	室温	8 ml	8 ml
裂解液 RLT Plus	室温	10 ml	25 ml
去蛋白液 RW1	室温	15 ml	40 ml
漂洗液 RW	室温	5 ml	10 ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	10 ml
PLANtaid	室温	2 ml	5 ml
基因组 DNA 清除柱 和收集管	室温	20 套	50 套
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	20 套	50 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. 不合适的储存于低温 (4℃ 或者 -20℃) 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℃ - 25℃) 进行。
2. 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：

本公司独家推出 HiFi 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，又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，可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液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 H₂O 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，可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
5. 适应性极其广泛，可以提取包括棉花、松针、冬青树叶、葡萄叶片、等 100 多种国内外试剂盒提取失败的样品。详细样品列表请参考公司主页产品介绍。
6. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.9~2.2，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(4℃离心也可以),使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机,如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 需要自备乙醇,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RLT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 HiFi Ex 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。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柱上消化处理。购

买DNA酶柱上消化试剂盒(货号: 1134)前可先索取具体操作说明书。

6. 仔细阅读补充说明2, 如果裂解液CLB效果好, 可以联系我们单独订购裂解液CLB, 或者购买试剂盒的时候, 指明将裂解液RLT换成裂解液CLB。

❖ 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!

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 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 放入研钵), 加入 **10 体积 (1ml) RLT 和 1 体积 (100 μ l) 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, 000rpm 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。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 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。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 的样品。

3. 将混合物(每次小于 720 μ l, 多可以分两次加入)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, 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(不用 RNase free 或者 DEPC 处理, 一般干净的新离心管即可。也可使用 RNA 吸附柱配套的新的干净收集管), 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, 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, 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。加入 500 μ 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 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。
10. 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 1:一般植物种类非常复杂,不同的植物种类和部位的样品使用本试剂盒(1138 HiFi Ex 植物 RNA 快速提取试剂盒)效果不同。部分的样品在经过基因组 DNA 清除柱清除残留 DNA 的同时可能会严重降低产量。该种情况下,建议客户可以尝试按照 1109 HiFi 植物 RNA 快速提取试剂盒的操作步骤进行提取。略去基因组 DNA 清除柱子的步骤。1109 和 1138 相比少一个基因组 DNA 清除柱的步骤,部分情况下可能会提高产量。如果 1109 提高产量的同时 DNA 残留也增多的情况下,客户可以根据实验需要加一个 DNA 酶柱上消化的步骤(货号: 1134)来清除残留 DNA 或者用传统的 DNA 酶消化来清除 DNA 残留。1109 HiFi 植物 RNA 快速提取试剂盒和 1138 HiFi Ex 植物 RNA 快速提取试剂盒的操作完全相同,就是省略了步骤 3 和 4,在步骤 1 和 2 后直接接步骤 5。

补充说明 2: 有一些特别复杂的样品使用裂解液 RLT 提取失败或者产量很低想提高产量的情况下, 可以尝试使用裂解液 CLB, 裂解液 CLB 是本公司最新研发配方, 测试的松针、丹参叶、胡杨叶、番茄叶表明可以提高产量一倍甚至数倍。

附录: 1138 HiFi Ex 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 2% β -巯基乙醇 (1ml CLB 加 20 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 100-150mg 细粉 (水分少的样品如种子叶片等可加 100mg, 水分多的样品如西瓜可多加一些) 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), 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 5-10%。

- 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。

- 5. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。