



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](mailto:blkwbio@blkwbio.com)

- ◆ HiFi 植物microRNA快速提取试剂盒
- ◆ 目录号 1140
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

---

## HiFi 植物 microRNA 快速提取试剂盒

目录号: 1140

目录编号	包装单位
114001	50次

❖ **适用范围:**

适用于快速提取植物组织细胞包括microRNA的总RNA

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次
裂解液 RLT Plus	室温	50 ml
PLANTaid	室温运输, 4° C 保存	5 ml
Wash Solution 1	室温	12 ml <i>第一次使用前加入 28ml 无水乙醇</i>
Wash Solution 2/3	室温	10 ml <i>第一次使用前加入 42ml 无水乙醇</i>
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 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/ $\beta$ -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, 然后裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱, 基因组 DNA 被清除而 RNA (包括 microRNA) 被选择性洗脱滤过。滤过的 RNA 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, 再通过一系列特殊漂洗液快速的漂洗—离心的步骤, 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 (包括 microRNA) 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. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 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。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 典型的比值达 1.9~2.0, 可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

---

❖ **注意事项：**

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，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， $\beta$ -巯基乙醇，一次性注射器（可选），研钵。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组吸附柱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含量时宁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Wash Solution 1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），该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，个别特殊情况需要清除微量基因组DNA残留，我们建议直接在吸附柱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，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：**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（10mM Tris, 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 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶加入指定量无水乙醇!
- ⇒ **对于 RNA 酶或者多酚特别丰富植物组织：**操作前在裂解液 RLT Plus 中加入  $\beta$ -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml RLT Plus 中加入 10 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT Plus 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 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 Plus 和 1 体积（100 $\mu$ 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。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，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 450 $\mu$ l 裂解物上清（不要超过基因组 DNA 清除柱能力，如残留基因组 DNA 较多，可适当减少取上清量）将裂解物上清加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。

d. 立刻接**操作步骤**项下 3。

**2. 液氮研磨法：**

a. 取 500 $\mu$ l 裂解液 RLT Plus，转入 1.5ml 离心管中，加 50 $\mu$ 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。

**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 1 ml(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 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。
  - e. **取裂解物上清(不要超过基因组 DNA 清除柱能力,如残留基因组 DNA 较多,可适当减少取上清量)**将裂解物上清加到 DNA 清除柱上(清除柱放在收集管内)。
  - f. 立刻接**操作步骤**项下 3。
3. 立即 13,000 rpm 离心 60 秒, 收集滤液 (RNA 在滤液中)。
  4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (450 $\mu$ l 左右, 滤过时候损失体积应该减去), 加入 1.25 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 700 $\mu$ 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 30 秒, 弃掉废液。
  6. 加 700 $\mu$ l Wash Solution 1 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
  7. 加入 500 $\mu$ l Wash Solution 2/3 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。加入 500 $\mu$ l Wash Solution 2/3, 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, 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。
  10. 得到的 RNA 可以立即用于下游反应或者尽快置于低温保存。