



RNApure Plant Kit

植物RNA提取试剂盒

目录号：CW0588S（50 preps）

保存条件：室温（15-30℃）

产品内容

Component	CW0588S 50 preps
Buffer RL	35 ml
Buffer RLC	35 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	11 ml
RNase-Free Water	10 ml
Spin Columns FL with Collection Tubes	50
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	50

产品简介

本试剂盒用于从各种植物中提取纯化高品质总RNA，也适用于真菌菌丝RNA的提取。独特的Shredder分离柱，用于匀质化和过滤高粘度的植物或真菌裂解物，同时采用硅基质膜吸附RNA进行纯化，使多聚糖等各种污染物通过洗涤被有效去除，经洗脱的RNA可直接用于各种下游实验。由本试剂盒提取RNA分子量大于200碱基，纯度高，几乎无DNA残留。如果是对微量DNA非常敏感的RNA实验，残留的DNA可利用无RNase的DNase I在柱上进行消化去除。提取的RNA可用于Northern Blot、Dot Blot、RT-PCR和体外翻译等实验。

自备试剂：β-巯基乙醇、无水乙醇（新开封或提取RNA专用）。

实验前准备及重要注意事项

1. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180℃高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无RNase的水。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
2. 提取的样品避免反复冻融，否则影响RNA提取的量和质量。
3. Buffer RL在使用前请加入β-巯基乙醇，至终浓度为1%。如1 ml Buffer RL加10 μl β-巯基乙醇。加入β-巯基乙醇的Buffer RL室温可保存1个月。Buffer RLC使用时不需加β-巯基乙醇。
4. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在Buffer RW2中加入无水乙醇。
5. Buffer RL和Buffer RLC如果产生沉淀，请加热使其溶解后室温放置。
6. 所有离心步骤若无特殊说明均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。
7. 若下游实验对DNA非常敏感，建议用不含RNase的DNase I（货号：CW2090S）对RNA进行处理。

操作步骤

1. **取植物新鲜组织50-100 mg**，加入液氮迅速研磨成粉末。
2. 将研磨后的粉末收集到离心管（自备）中，加入**600 μ l Buffer RL（使用前检查是否加入 β -巯基乙醇）或Buffer RLC**，涡旋振荡使其充分裂解。

注意：1）Buffer RL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（如玉米的胚乳），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，此时可加入Buffer RLC替代Buffer RL。

2）56 $^{\circ}$ C孵育1-3分钟有助于组织的裂解，但是淀粉含量高的植物不要进行高温孵育。

3. 将步骤2所得全部液体转移至已装入收集管的过滤柱（Spin Columns FL）中，12,000 rpm（~13,400 \times g）离心2分钟，将收集管中的上清液转移到一个新的离心管（自备）中。

注意：1）在吸取液体时可以将枪头尖端剪掉，便于取样。

2）Spin Columns FL可以除去大部分的碎片，但仍会有小部分流出，离心后会在收集管内形成沉淀，在进行下一步时注意避免吸到沉淀。

4. 在步骤3所得干净的裂解液中加入**0.5倍体积的无水乙醇**，迅速混匀。

注意：加入乙醇后可能会产生沉淀，但不影响后续试验。

5. 将步骤4得到的溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RM）中，若一次不能将全部溶液加入吸附柱中，请分两次转入。12,000 rpm离心15秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

6. 向吸附柱中加入**700 μ l Buffer RW1**，12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

可选步骤：如果要进行对微量DNA非常敏感的RNA实验，则用以下步骤替代步骤6。

1) 向吸附柱中加入350 μ l Buffer RW1，12,000 rpm离心15秒，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。

2) 配制DNase I 混合液：取52 μ l RNase-Free Water，向其中加入8 μ l 10 \times Reaction Buffer 和20 μ l DNase I (1 U/ μ l)，混匀，配制成终体积为80 μ l的反应液。

注意：以上体系为按照我公司产品DNase I（CW2090S）反应体系进行配置，应用其他公司产品请参考相应说明书。

3) 向吸附柱中直接加入80 μ l DNase I反应液，20-30 $^{\circ}$ C孵育15分钟。

4) 向吸附柱中加入350 μ l Buffer RW1，12,000 rpm离心15秒，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。

7. 向吸附柱中加入**500 µl Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇)**，12,000 rpm离心15秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
8. 重复步骤7。
9. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干吸附柱中的无水乙醇。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR等)。

10. 将吸附柱置于一个新的无RNase离心管中，向吸附柱的中间部位悬空加入**30-50 µl RNase-Free Water**，室温放置1分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集RNA溶液，-70℃保存RNA，防止降解。

注意：1) RNase-Free Water体积不应小于30 µl，体积过小影响回收率。

2) 如果要提高RNA的产量，可用30-50 µl新的RNase-Free Water重复步骤10。

3) 如果要提高RNA浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤10。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其他用途