

HiPure Plant RNA Maxi Kit

植物总 RNA 大提试剂盒

产品简介

本产品适合于从1~5g植物或真菌样品中提取总RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，整个提取过程只需60分钟。试剂盒采用DNA过滤技术，可高效地过滤去除DNA。本产品包括两套溶液体系，几乎可以解决所有植物或真菌样品的RNA抽提。

产品组份

产品编号	R4153-01	R4153-02	R4153-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Maxi Columns	2	10	50
gDNA Filter Maxi Columns	2	10	50
50ml Collection Tubes	4	20	100
Buffer RLC	40 ml	200 ml	2 x 500 ml
Buffer PRC1	40 ml	200 ml	2 x 500 ml
Buffer PRC2	40 ml	200 ml	2 x 500 ml
Buffer RVV1	25 ml	120 ml	550 ml
Buffer RVV2	20 ml	50 ml	3 x 100 ml
RNase Free Water	10 ml	30 ml	100 ml
说明书	1	1	1

版本号：202401

保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 18 个月。低温下, Buffer RLC/PRC1 可能会有沉淀形成, 55℃水浴让沉淀完全溶解。因 RNase Free Water 不含抑菌剂, 室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。推荐分装并保存于 2~8℃, 以减少污染。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 于室温保存。
- (可选)提升裂解液的变性能力:使用前分装适量的 Buffer RLC/Buffer PRC1,按每 ml Buffer RLC/Buffer PRC1 加入 20 μ l β -巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP, 该混合液室温可保存 1 周。由于 β -巯基乙醇/DTT 的毒性, 多数情况下, 不添加也可得到完整的 RNA。
- 多酚类样品(葡萄/芒果/茶叶等): 在 Buffer PRC1 中, 加入 PVP-40 至终浓度为 2% (W/V), 完全溶解后再进行提取, 可以解决大部分多酚类样品提取失败的问题。由于 PVP-40 会干扰 gDNA Filter Column 过滤效果, 加入 PVP-40 至 Buffer RLC/PRC1 后, DNA 污染会加重, 建议 DNA 酶上消化法进一步去除 DNA。
- 受植物多样性影响, 且生不同生长发育阶段组织 RNA 含量差异显著, 初次实验时, 常规植物用 1000mg, 富含粘液质的组织样品用 500mg 进行提取。根据实验结果调整样品用量, 易提取样品, 如玉米叶片、拟南芥叶片、水稻叶片等, 样品用量可高达 5g。
- 失败样品: 由于植物中代谢物质含量差异很大, 本方案虽然解决大部分的样品部分, 但本产品未能解决问题, 请订购 Buffer PSL 代替 Buffer RLC。

实验步骤

A. 简易的植物/真菌样品(经济作物类、丝状真菌)

该方案能快速从次生代谢物质较少的植物/真菌样品中提取的总 RNA, 如水稻、玉米、黄豆、番茄、棉花、烟草等。若该方案提取失败, 建议尝试 B 方案。

1. 用液氮将植物或真菌样品研磨成细小粉末。称取 2~4g 粉末至 50ml 预冷的离心管中, 立即加入 16ml Buffer RLC 至样品中, 高速涡旋 15~30 秒打散样品。

研磨好的样品在称量、转移、存放或加入 RLC 之前都不能解冻, 否则 RNA 会降解。加入 Buffer RLC 后要立即涡旋 10-15 秒让样品充分分散, 成团样品用移液器吸打辅助分散, 然后再进行第二个样品研磨匀浆操作。室温下, 4,000~5,000 \times g 离心 10 分钟。

2. 把 gDNA Filter Maxi Column 装在 50ml 收集管中。转移全部上清液转移至过滤柱中。4,000~5,000 \times g 离心 5 分钟, 弃去 gDNA 过滤柱。

3. 加入 0.5 倍体积无水乙醇(~8ml)至滤液中，涡旋混匀 10 秒，按第 5 步进行操作。

B. 复杂的植物/真菌样品(多糖多酚类)

该方案适合从各种植物和真菌样品抽提 RNA。成功提取的样品：富含多酚类植物样品如葡萄叶片、白松叶片、红背桂叶片、棉花、荔枝叶片等。富含多糖类的植物样品，如蕃薯叶片，花生叶片、香蕉叶片等。

1. 用液氮将植物或真菌样品研磨成细小的粉末。称取 1.5~3g 粉末至 50ml 预冷的离心管中，立即加入 16ml Buffer PRC1/ β -ME，高速涡旋 10~15 秒打散样品。

研磨好的样品在称量、转移、存放或加入 PRC1 之前都不能解冻，否则 RNA 会降解。加入 Buffer PRC1 后要立即涡旋 10-15 秒让样品充分分散，成团样品用移液器吸打辅助分散，然后再进行第二个样品研磨匀浆操作。55°C 短暂水浴 3~5 分钟。室温下，4,000~5,000 \times g 离心 10 分钟。

处理富含淀粉类样品，加入裂解液后室温静置 3~5 分钟代替 55°C 水浴，以防止淀粉糊化。

2. 把 gDNA Filter Maxi Column 装在 50ml 收集管中，转移上清液转移至过滤柱中。4,000~5,000 \times g 离心 5 分钟，弃去 gDNA 过滤柱。

3. 加入等倍体积的 Buffer PRC2 至滤液中，涡旋混匀 10 秒。按第 5 步进行操作。

加入 Buffer PRC2 混匀后，若出现大量沉淀时，补加 10ml Buffer PRC1 混匀，减少沉淀量避免过柱时引起堵塞。同一种样品下次提取时，控制 Buffer PRC2 用量，加入 0.5 倍体积的 Buffer PRC2 或加入 0.5 倍体积的无水乙醇。

过柱纯化 RNA

4. 把 HiPure RNA Maxi Column 装在 50ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。4,000~5,000 \times g 离心 3 分钟。

5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。4,000~5,000 \times g 离心 3 分钟。

出现堵柱时，延长离心时间至 10 分钟。若堵柱情况没有解决，用移液器的枪头轻轻刮动数次让柱子中表层的滤膜刮破。

6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 10ml Buffer RW1 至柱子上。4,000~5,000 \times g 离心 3 分钟

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 10ml Buffer RW2 至柱子中，4,000~5,000 \times g 离心 3 分钟

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 10ml Buffer RW2 至柱子中，4,000~5,000 \times g 离心 3 分钟

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。4,000~5,000 x g 离心 10 分钟
10. 将柱子转移至 15ml 离心管。**加入 800µl RNase Free Water 至柱子膜中央。**室温静置 2 分钟。4,000~5,000 x g 离心 5 分钟。
11. **再加入 800µl RNase Free Water 至柱子膜中央。**室温静置 2 分钟。4,000~5,000 x g 离心 5 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量，超量样品反而会降低产量和纯度。由于植物样品的复杂性，降低样品量至 20~30mg。
- **富含多糖类样品：**采用 B 方案进行抽提，或降低样品量至 20~30mg。
- **裂解液离心不充分：**加大裂解液的用量，延长裂解液的离心时间以去除高分子量杂质。
- **室温静置代替 55°C 温浴：**处理淀粉丰富样品，如种子，加入 Buffer PRC1 混匀后，室温放置 3~5 分钟代替 55°C 水浴。高温会引起淀粉糊化。

2. RNA 产量低

- **洗脱不充分：**RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置几分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。
- **多酚氧化：**处理多酚类物质，加入 PVP-40 至 Buffer PRC1 至终浓度为 2%(W/V)，溶解后再抽提。
- **B 方案更通用：**实验表明，若使用 A 方案提取失败，B 方案都可以提取成功。

3. RNA 降解

- **RNase Free Water 被污染：**RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的 RNase Free Water 或 DEPC 处理水。
- **样品贮藏问题：**反复解冻会引起 RNA 降解，确保样品解冻次数不要超过 2 次。
- **裂解问题：**液氮研磨后不要让样品解冻，快速加入裂解液并立即打散样品。样品只能充分裂解打散后，内源的核酸酶才能被灭活，RNA 才不会降解。
- **电泳原因：**常见的 RNA 降解现象都是电泳过程中引起的。更换新的 Loading Buffer 和电泳缓冲液。

4. DNA 的污染

- **DNase I 消化：**gDNA 过滤柱可去除 95~99% 的 DNA 污染。DNA 去除效果取决样品类型和用量。若纯化的 RNA 用于 RT-PCR，建议订购我司的 DNase on Column Kit 进行膜上 DNase 消化以彻底去除 DNA。