

HiPure Plant RNA Plus Kit

多酚多糖类植物总 RNA 试剂盒

产 品 简 介

本产品适合于从50~150mg常规和多酚多糖类的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20~30分钟。试剂盒采用DNA过滤技术，可高效地过滤去除DNA。得到的RNA可直接用于RT-PCR、Northern Blot、poly A⁺纯化、核酸保护和体外翻译等实验。

产 品 组 份

产 品 编 号	R4150-01	R4150-02	R4150-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	5 x 100
TCEP (1M)	/	0.39 g	5 x 0.39 g
Buffer EP	/	1.5 ml	8 ml
Buffer RLF	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer PAL	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2 *	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.5 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

版本：202405

保存条件

本产品可以在室温(15~25℃)保存 18 个月,收到产品后,最好把 TCEP(干粉)保存于-20~8℃。低温下,Buffer RLF/PAL 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。
- TCEP 的溶解:取出 TCEP(干粉),每支加入 1ml Buffer EP,颠倒混匀,溶解后待用。溶解后的 TCEP 可以在 2-8℃保存 3 个月,-20℃保存 6 个月。TCEP,中文名为三(2-羧乙基)膦酸盐,是一种高效、无异味、不含硫醇基还原剂,可高效灭活核酸酶和防止多酚氧化,可代替 2-巯基乙醇,提高 RNA 的完整性和得率。
- 使用前,每 1ml Buffer RLF/PAL 中加入 20μl TCEP 或 50μl 2-巯基乙醇,以提高裂解和抗氧化能力,混合液在 2-8℃可以放置 1 周。

实验步骤 A

1. 用液氮将植物或真菌研磨成粉末,称取 50-150mg 粉末至 2.0ml 离心管中。加入 0.9ml Buffer RLF 至样品中,立即涡旋 10~15 秒让样品充分分散。
- 使用前,每 1ml Buffer RLF 中加入 20μl TCEP 或 50μl 2-巯基乙醇,以提高裂解和抗氧化能力,混合液在 2-8℃可以放置 1 周。
 - 研磨好的样品在称量、转移、存放或加入 RLF 之前都不能解冻,否则 RNA 会降解。加入 Buffer RLF 后要立即涡旋 10-15 秒让样品充分分散,成团样品可以用移液器吸打辅助分散,然后再进行第二个样品研磨操作。
 - 处理易研磨植物样品[水果果实/鲜嫩叶片等],直接转移 50~150mg 样品和 1.0ml Buffer RLF 至研钵中研磨或电动匀浆器研磨,然后转移 0.8ml 匀浆液至离心管中,按第 2 步进行操作。
 - 受植物样品多样性影响,且生不同生长发育阶段组织 RNA 含量差异显著,初次实验时,常规植物或多酚类样品用 100mg,富含粘液质的组织样品用 50mg 进行提取,根据实验结果调整样品用量,但最高不建议超过 150mg。
 - 淀粉类样品:如水稻种子、根块富含淀粉的样品,Buffer RLF 会引起淀粉糊化造成裂解液粘

稠固化。处理这种样品时，使用方案 B。

- 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，请尝试使用方案 B。方案 B 采用经典的 CTAB 裂解液，提供了另一种解决方案。
2. 室温下， $12,000 \times g$ 离心 5 分钟。
 3. 把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。转移 750 μ l 上清液转移至 gDNA 过滤柱中。 $12,000 \times g$ 离心 2 分钟，弃去 gDNA 过滤柱。
 4. 加入 0.4 倍体积无水乙醇($\sim 300\mu$ l) 至滤液中，用移液枪吸打 3~5 次。
 5. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。 $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
 6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移余下的混合液至柱子中， $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
若需彻底去除 DNA，建议订购 (R4911) DNase on Column Kit 进行膜上 DNase 消化，按 DNase 消化步骤进行消化。
 7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 700 μ l Buffer RW1 至柱子上。 $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
 8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 700 μ l Buffer RW2 至柱子中， $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
Buffer RW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
 9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 700 μ l Buffer RW2 至柱子中， $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
 10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。 $12,000 \times g$ 离心 2 分钟。
 11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~100 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。 $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C 。
柱子最小的洗脱体积是 30 μ l，若 RNA 产量超过 30 μ g，推荐进行第二次洗脱。

实验步骤 B (淀粉类, 或疑难样品)

1. 用液氮将植物或真菌磨成粉末, 称取 50~100mg 粉末至 2.0ml 离心管中, 加入 0.7ml Buffer PAL 至样品中, 立即剧烈涡旋充分打散样品, 65°C 放置 5 分钟。
 - 处理易研磨的植物样品(水果果实/鲜嫩叶片等), 转移 50~150mg 样品至研钵中, 加入 1.0ml Buffer PAL/TCEP 至研钵中, 立即进行充分的研磨, 然后转移 0.7ml 匀浆液至 2.0ml 离心管中, 65°C 放置 5 分钟, 按第 2 步进行操作。
 - 使用前, 每 1ml Buffer PAL 中加入 16 μ l TCEP 或 50 μ l 2-巯基乙醇, 以提高裂解和抗氧化能力, 混合液在 2-8°C 可以放置 1 周。
2. 加入 0.7ml 氯仿, 涡旋混匀 10 秒, 室温下, 12,000 $\times$ g 离心 5 分钟。
脂质和蛋白质类种子类样品用酚氯仿代替氯仿抽提效果更好。
3. 转移 0.5ml 上清液至离心管中, 加入 0.5 倍无水乙醇, 涡旋混匀 10 秒。
4. 把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中, 转移全部混合液(含沉淀)至柱子中, 12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。
5. 倒弃滤液, 把柱子装在新收集管中, 加入 500 μ l Buffer RLF 至柱子中, 静置~3 分钟, 12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。
6. 弃去 gDNA Filter Column, 加入 250 μ l 无水乙醇至滤液, 吸打混匀 3-5 次。
7. 把 HiPure RNA Mini Column 装在旧的收集管中。转移全部混合液至柱子中。12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 700 μ l Buffer RW2, 12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 700 μ l Buffer RW2, 12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管。12,000 $\times$ g 离心 2 分钟。
11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~100 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。弃去柱子, 把 RNA 保存于 -80°C。
柱子最小的洗脱体积是 30 μ l, 若 RNA 产量超过 30 μ g, 推荐进行第二次洗脱。