

高多糖多酚植物总 RNA 试剂盒说明书

产品组成

高多糖多酚植物总 RNA 试剂盒 Cat. No.	5 次样品 5103005	50 次制备 5103050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
RNase-free 1.5 ml 收集管	5 个	50 个
β -巯基乙醇	50 μ l	500 μ l
Buffer RCT	4 ml	32 ml
Buffer EX	4 ml	32 ml
Buffer K	2 ml	20 ml
Buffer WA (浓缩液)	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR (浓缩液)	1.5 ml	10 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml \times 3
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

试剂盒储存于常温（0~30°C），可在两年内保持使用性能无明显变化。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品适合从 50-200 mg 植物中分离纯化总 RNA。植物组织经裂解液和 Buffer EX 抽提获得含有 RNA 的上清液，补加乙醇后加入纯化柱，RNA 结合在纯化柱上，溶解的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去。RNA 经两种洗液洗涤后，用 RNase-free Water 洗脱，即可用于 RT-PCR, Northern blot, Dot blot, mRNA 分离等各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇和 70% 乙醇
2. RNase-free 1.5 ml 离心管
3. 移液器及吸头（为避免 RNA 酶的污染，建议选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 旋涡振荡器
7. 无 RNA 酶使用的实验室

使用前准备

1. 检查 Buffer RCT 是否有不溶物析出，若有不溶物请于 60°C 温育溶解，颠倒混匀后再使用。
2. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
3. 每 1 ml Buffer RCT 中加入 10 μ l β -巯基乙醇，混合均匀。加入 β -巯基乙醇的 Buffer RCT 一个月内使用不影响实验结果。
4. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
5. 因为唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，所以 RNA 提取的全过程都需要戴乳胶手套和口罩。
6. 若后续实验需要彻底除去 DNA，请增加 DNase I 消化步骤，DNase I 柱上消化试剂盒（Simgen, Cat.No.8010050）需自行购买。

操作步骤：

1. 可选用以下方法研磨植物组织。

A. 研磨机研磨：用 2 ml 离心管称取 50~200 mg 植物组织，加入玻璃珠/钢珠，放入研磨机模块中，将模块放入液氮中冷冻 30 秒，即可将模块安装到研磨机上进行研磨。

* 必须将组织研磨至面粉状，否则会严重影响最终 RNA 的得率。若样本未研磨至面粉状，可将离心管放回模块中再次经液氮冷冻后，重复研磨至面粉状。

* 只有 RNA 含量低的样本（如土豆块茎、西瓜瓜瓢等）才推荐用到 200 mg 组织的用量；对于嫩叶、嫩芽等 RNA 含量高的样本，用量应控制在 100 mg 以内，否则可能导致过滤柱或纯化柱堵塞；新鲜嫩芽中核酸含量高，如果提取的 RNA 中有基因组 DNA 残留，推荐增加 DNase I 消化步骤。

B. 研钵研磨：称取 200~500 mg 植物组织，加入液氮，将组织研磨至面粉状，用液氮预冷的 1.5 ml 离心管称取 50~200 mg 组织粉末。

* 必须将组织研磨至面粉状，否则会严重影响最终 RNA 的得率。

* 研磨组织时应及时补加液氮，避免组织融化，以免内源性的 RNA 酶恢复活性而降解 RNA。

2. 加入 600 μ l 已加入 β -巯基乙醇的 Buffer RCT，盖上管盖，旋涡振荡直至组织全部溶解。

3. 加入 600 μ l Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃混匀，12000 rpm 离心 5 分钟。

4. 在过滤柱中加入 200 μ l Buffer K 备用。

5. 小心吸取 500 μ l 步骤 3 中的上清转入已加入 Buffer K 的过滤柱中，直接用吸头吸注 3-5 次混合均匀，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果上清不足 500 μ l，则吸取全部上清加入到过滤柱中。注意尽量不要带入中间层的沉淀物。

* 请勿省略本步骤，否则可能导致后续的操作步骤中堵塞纯化柱，并且提取的 RNA 中有基因组 DNA 残留。

6. 弃过滤柱，向滤液中加入 700 μ l 70% 乙醇并直接用吸头吸注 6-8 次混合均匀，吸取 700 μ l 混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 加入 70% 乙醇混合后如果有沉淀产生，请将沉淀一起加入到核酸纯化柱中。

7. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，吸取剩余的混合液加入到核酸纯化柱中，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

8. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

9. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 μ l Buffer WBR，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

10. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 RT-PCR 效果。

11. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个新的 RNase-free 1.5 ml 收集管中，在纯化柱的膜中央加入 50-100 μ l RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，13000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免 RNase-free 1.5 ml 收集管管盖脱落而损伤离心机。

12. 弃纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 -70°C 以下备用。