

## 果肉总 RNA 试剂盒说明书

### 产品组成

果肉总 RNA 试剂盒	5 次样品	50 次制备
Cat. No.	5102005	5102050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
$\beta$ -巯基乙醇	50 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Buffer RLP	3 ml	30 ml
Buffer WA	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR	1.5 ml	9.5 ml
RNase-free Water	1.5ml	2 ml $\times$ 3
说明书	1 份	1 份

### 产品储存与有效期

试剂盒如果储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上。

### 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

本产品不涉及酚氯仿的使用，适合从 500 mg 含高糖分且多汁的植物组织中分离纯化总 RNA。植物组织经裂解液溶解并释放 RNA，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. 液氮、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. 台式少量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 研钵、旋涡振荡器
7. 无 RNA 酶使用的实验室

### 使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 每 1 ml Buffer RLP 中加入 10  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇，混合均匀。加入  $\beta$ -巯基乙醇的 Buffer RLP 一个月内使用不影响实验结果。
3. 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。
4. 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。

## 操作步骤：

**1. 在研钵中加入约 2~5 g 植物组织，加入液氮，将组织研磨至粉末状，再用液氮预冷的 1.5 ml 离心管称取 450~500 mg 研磨成粉末状的组织。**

\* 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 酶复活活性而降解 RNA。

\* 勿使用超过 500 mg 组织，否则可能导致过滤柱堵塞，并使纯化的 RNA 中混有基因组 DNA 污染。

\* Buffer RLP 具腐蚀性，请戴防护用品进行操作。

**2. 加入 500  $\mu$ l 已加入 $\beta$ -巯基乙醇的 Buffer RLP，旋涡振荡直至组织全部溶解。13000 rpm 离心 2 分钟。**

**3. 吸取 700  $\mu$ l 步骤 2 中的离心上清并转移到过滤柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。**

\* 此步骤可除去大部分基因组 DNA，请勿省略。

\* 如果溶解物不能全部滤过过滤柱，说明组织中核酸含量过高。此时应吸取 300  $\mu$ l 滤液转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，再加入 300  $\mu$ l 70% 乙醇到 1.5 ml 离心管中并用吸头吸注 6~8 次混合均匀，然后将全部混合液转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，13000 rpm 离心 1 分钟。过滤柱及残余的滤液则丢弃不用，然后直接进入步骤 6 的操作。

**4. 弃过滤柱，向滤液中加入 700  $\mu$ l 70% 乙醇并直接用吸头吸注 6~8 次混合均匀，吸取 700  $\mu$ 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。

**5. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，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，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

**6. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，加入 500  $\mu$ 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。

**7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，加入 600  $\mu$ 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。

**8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，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。

**9. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 50~100  $\mu$ 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 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

**10. 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。**

\* 即使电泳检测观察不到 DNA 条带，也不应认为纯化的 RNA 中不含基因组 DNA 污染，若需要彻底除去 DNA，请用不含 RNA 酶的 DNase I 消化残留的 DNA。