

## 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	5 次制备	50 次制备
Cat. No.	5103005	5103050
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 RCT	4 ml	32 ml
Buffer EX	4 ml	32 ml
Buffer K	2 ml	20 ml
Buffer WA	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR	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 是否有沉淀物析出，如有沉淀物请于 60℃ 温育溶解后再使用。
2. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
3. 每 1 ml Buffer RCT 中加入 10  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇，混合均匀。加入  $\beta$ -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. 在研钵中称取200~500 mg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50~200 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 酶恢复活性而降解 RNA。

\* 只有 RNA 含量低的样本（如土豆块茎、西瓜瓜瓤等）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，提取的 RNA 也可能会出现降解现象。

\* 新鲜嫩芽中核酸含量高，基因组 DNA 可能会残留比较多，推荐进行 DNase I 消化。

**2. 加入600  $\mu$ l已加入 $\beta$ -巯基乙醇的Buffer RCT，旋涡振荡直至组织全部溶解。**

**3. 加入600  $\mu$ l Buffer EX，用力混合均匀，12000 rpm 离心5分钟。**

**4. 小心吸取350  $\mu$ l 上清液，转入一个洁净的1.5 ml 离心管中。**

\* 注意不要带入中间的蛋白沉淀物。

**5. 在上清液中加入350  $\mu$ l Buffer K并直接用吸头吸注6-8次混合均匀，将混合液全部转移到过滤柱中，盖上管盖，13000 rpm离心1分钟。**

\* 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。

**6. 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。

**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，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。

**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，在核酸纯化柱中加入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。

**9. 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，在核酸纯化柱中加入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。

**10. 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。

**11. 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。

**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 $^{\circ}$ C以下备用。**