

版本号: DP121221

RNAplant Plus Reagent

RNAplant Plus植物总RNA提取试剂

目录号: DP437

产品内容

目录号	产品组成
DP437-01	16 ml
DP437-02	80 ml

产品简介

RNAplant Plus试剂可从植物组织，特别是富含多酚或淀粉的植物组织（如马铃薯块茎，白松松针，吊兰叶片，山药，香蕉，苹果，木瓜，梨等）中提取高纯度的总RNA。

每100 ml（加入 β -巯基乙醇后的终体积）可处理100 mg组织200次，处理5 g组织4次。

储存条件

室温(15-25 $^{\circ}$ C)运输并保存，添加 β -巯基乙醇之后4 $^{\circ}$ C保存，保存6个月。

准备试剂

β -巯基乙醇, 液氮, 研钵, 无RNase离心管, 5 M NaCl, 氯仿, 异丙醇, 75%乙醇, 无RNase水。

样品处理

1. 准备新鲜植物组织, 在液氮中研磨成粉状, 如果是干种子, 可在室温研磨。
2. 处理过的植物材料应一直保持置于 -70°C 冷冻保存, 直至加入提取试剂并悬浮。
3. 先将无RNase离心管置于干冰中再放入研磨好的冷冻的组织样品。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

使用前请按照1: 4的体积比将 β -巯基乙醇与RNAplant Plus reagent混合。

小规模提取操作步骤: (样品 $<0.1\text{ g}$, 使用小规模提取方法)

1. 取不多于 0.1 g 冷冻的研磨过的植物组织, 加 0.5 ml 提取试剂(4°C), 振荡至彻底混匀。
2. 室温放置 5 min 。注意: 平放离心管, 使表面积最大。
3. 4°C $12,000\text{ rpm}$ 离心 1 min , 上清转入新的无RNase离心管。
4. 加入 0.1 ml 5 M NaCl , 温和混匀。
5. 加入 0.3 ml 氯仿, 上下颠倒混匀。
6. 4°C $12,000\text{ rpm}$ 离心 10 min , 取上层水相转入新的无RNase离心管。

注意: 若提取富含多酚或淀粉的植物组织, 可重复步骤5、6一次

7. 加与所得水相等体积的异丙醇, 混匀, 室温放置 10 min 。
 8. 4°C $12,000\text{ rpm}$ 离心 10 min 。弃掉上清, 注意不要倒出沉淀。加 1 ml 75% 乙醇。(沉淀可能很难看见, 应小心操作。)
 9. 4°C $5,000\text{ rpm}$ 离心 3 min 。倒出液体, 注意不要倒出沉淀。剩余的少量液体短暂离心, 然后用枪头吸出, 室温晾干 $2-3\text{ min}$ 。
 10. 加 $50\text{ }\mu\text{l}$ 无RNase水, 反复吹打、混匀, 充分溶解RNA。如有絮状物, 可在室温条件下 $12,000\text{ rpm}$ 离心 1 min , 取上清转入干净的无RNase离心管中, -70°C 保存。
-

大量提取操作步骤（样品>0.1 g到5 g，使用大量提取方法）：

1. 每1 g冷冻的研磨过的植物组织，加5 ml试剂，振荡至彻底混匀。
2. 室温放置5 min。注意：平放离心管，使表面积最大。
3. 4°C 10,000 rpm离心1 min，上清转入新的无RNase离心管。
4. 每10 ml上清加2 ml 5 M NaCl，混匀。
5. 每10 ml上清加6 ml 氯仿，上下颠倒混匀。
6. 4°C 10,000 rpm离心15 min，取上层水相转入新的无RNase离心管。

注意：若提取富含多酚或淀粉的植物组织，可重复步骤5、6一次

7. 测量所得水相体积，加0.9倍体积异丙醇，混匀，室温放置10 min。
 8. 4°C 10,000 rpm离心15 min。弃掉上清，注意不要倒出沉淀。加5–10 ml 75%乙醇。
 9. 4°C 5,000 rpm离心5 min。小心倒出液体，注意不要倒出沉淀。剩余的少量液体短暂离心，然后用枪头吸出，室温晾干3-5 min。
 10. 加无RNase水，反复吹打、混匀，充分溶解RNA（例如，每1 g叶片可用200 μ l左右无RNase水溶解）。如有絮状物，可将RNA溶液转移至1.5 ml无RNase离心管中室温12,000 rpm离心1 min，取上清转入干净的无RNase离心管中，-70°C保存。
-

常见问题及解决办法

问题	原因	解决方法
RNA得率低	A. 样品研磨不充分 B. 样品未与试剂充分混合 C. 样品RNA含量少	A. 将样品充分研磨成粉末 B. 充分振荡，彻底混合样品 C. 每ml提取液加1 μ l glycogen (20 μ g/ μ l) 有助RNA沉淀
RNA降解	A. 样品储存方法不当 B. 加入试剂前样品已解冻	A. 样品收集后或需长期保存时应置于-70 $^{\circ}$ C B. 样品应一直保持-70 $^{\circ}$ C直至加入试剂并悬浮
A_{260}/A_{280} 比率低	A. RNA溶于水	A. 将RNA溶于10 mM Tris-HCl (pH7.5)进行紫外检测
废弃物有异味	A. 本试剂中含 β -巯基乙醇	A. 废弃物用水稀释，加几毫升3%双氧水，过夜，用碳酸氢钠调pH降低酸性

预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
 2. 使用灭过菌的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 3. RNA在RNAplant Plus提取试剂中时不会被RNase污染。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150 $^{\circ}$ C烘烤4h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
-