

版本号: DP140916

# RNAPrep Pure Plant Kit

## RNAPrep Pure植物总RNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP432

### 产品内容

产品组成	DP432 (50 preps)
裂解液RL (Buffer RL)	30 ml
去蛋白液RW1 (Buffer RW1)	40 ml
漂洗液RW (Buffer RW)	12 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O (瓶装)	15 ml
RNase-Free吸附柱CR3 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR3 in a 2 ml Collection Tube)	50 套
RNase-Free过滤柱CS (含2 ml收集管) (RNase-Free Filtration Column CS in a 2 ml Collection Tube)	50 套
DNase I(1500 U)	1 支
缓冲液RDD (Buffer RDD)	4 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O (管装)	1 ml
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5ml)	50 个

### 储存条件

RNase-Free DNase I, 缓冲液RDD和RNase-Free ddH<sub>2</sub>O(管装)置于2-8°C保存; 加入β-巯基乙醇的裂解液RL 4°C可放置一个月; 其他试剂室温(15-25°C)保存。

---

## 产品简介

本试剂盒可从植物组织中快速提取总RNA，可同时处理大量不同样品。提取的总RNA纯度高，没有蛋白和其它杂质的污染，可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

## 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. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在裂解液RL中时不会被RNase降解。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°C烘烤4 h，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。
4. 配制溶液应使用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(V/V)，混匀后放置过夜，高压灭菌。）

## RNA得率

植物叶片(100 mg)	总RNA量(μg)
拟南芥	~35
玉米	~25
西红柿	~65
烟草	~60

## 使用前注意事项

- 1 操作前在RL中加入β-巯基乙醇至终浓度1%，如1 ml RL中加入10 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RL 4°C可放置一个月，裂解液RL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
  - 2 植物组织裂解是否充分直接影响到RNA提取的质量和产量，本试剂盒中提供的裂解液RL，主要成分为异硫氰酸胍，适用于大多数植物组织的裂解，但有些植物组织（例如玉米的乳白色胚乳）或丝状真菌，由于次级代谢产物较特殊，异硫氰酸胍使样品产生沉淀，导致RNA提取效果不佳的现象，此时可以向TIANGEN公司免费索取另一种裂解液HL，将解决该问题。
  - 3 第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
  - 4 以下操作如非指明，均在室温下进行。
-

---

## DNase I 储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550  $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。

**注意：**从-20 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。

### 操作步骤

#### 1. 匀浆处理:

50-100 mg植物叶片在液氮中迅速研磨成粉末，加入450  $\mu$ l RL（使用前请先检查是否已加入 $\beta$ -巯基乙醇），涡旋剧烈震荡混匀。

**注意1：**在56 $^{\circ}$ C孵育1-3 min将有助于植物组织裂解，但是对于某些富含淀粉的样品，请不要加热处理，防止因淀粉引起的样品膨胀现象。

**注意2：**由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的RNA含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

#### 2. 将所有溶液转移至过滤柱CS上(过滤柱CS放在收集管中)，12,000 rpm(~13,400 $\times$ g) 离心2-5 min，小心吸取收集管中的上清至RNase-Free的离心管中，吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。

**注意：**由于裂解液较粘稠，所以将溶液转移至过滤柱时，可以剪去部分吸头末端。

#### 3. 缓慢加入0.5倍上清体积的无水乙醇（通常为225 $\mu$ l），混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中，12,000 rpm(~13,400 $\times$ g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

**注意：**如果上清液体积有损失，请相应调整乙醇的加量。

#### 4. 向吸附柱CR3中加入350 $\mu$ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400 $\times$ g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

#### 5. DNase I 工作液的配制：取10 $\mu$ l DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70 $\mu$ l RDD溶液，轻柔混匀。

#### 6. 向吸附柱CR3中央加入80 $\mu$ l的DNase I 工作液，室温放置15 min。

#### 7. 向吸附柱CR3中加入350 $\mu$ l 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400 $\times$ g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

---

---

8. 向吸附柱CR3中加入500  $\mu\text{l}$ 漂洗液RW (使用前请先检查是否已加入乙醇)，室温静置2 min，12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

9. 重复步骤8。

10. 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意：**此步骤目的是将吸附柱CR3中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的RT等实验。

11. 将吸附柱CR3放入一个新的RNase-Free离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100  $\mu\text{l}$  RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，室温放置2 min，12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min，得到RNA溶液。

**注意：**洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu\text{l}$ ，体积过小影响回收效率。RNA样品请在-70 $^{\circ}\text{C}$ 中保存。

## RNA纯度及浓度检测

**完整性：** RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件：胶浓度1.2%；0.5 $\times$ TBE电泳缓冲液；150v，15 min)检测完整性。由于细胞中70%-80%的RNA为rRNA，电泳后UV下应能看到非常明显的rRNA条带。rRNA大小分别约为5 kb和2 kb，分别相当于28S和18S rRNA；植物叶片中由于含有大量的叶绿体RNA，可见4条或更多 rRNA。植物RNA样品中最大rRNA亮度应为次大rRNA亮度的1.5-2.0倍，否则表示RNA样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

**纯度：**  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA， $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 读数在1.8-2.1之间，比值为2.0是高质量RNA的标志。 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 读数受测定所用溶液的pH值影响。同一个RNA样品，假定在10 mM Tris，pH7.5溶液中测出的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 读数1.8-2.1之间，在水溶液中所测读数则可能在1.5-1.9之间，但这并不表示RNA不纯。

**浓度：** 取一定量的 RNA 提取物，用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O稀释n 倍，用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O将分光光度计调零，取稀释液进行 $\text{OD}_{260}$ ， $\text{OD}_{280}$ 测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times (\text{稀释倍数}n) \times 40$$

---