植物总 RNA 提取试剂盒 II

（离心柱型）
目录号：GF432

产品内容

产品组成	GF432 / (50 preps)
裂解液 RL (Buffer RL)	30 ml(使用前加入 300ul 的巯基乙醇)
溶液 RW (Buffer RW)	55 ml
DNase I (4U/10ul)	600 ul
DNA 消化缓冲液 (Buffer RDD)	5 ml
漂洗液 PW (Buffer PW)	16 ml（使用前请先加入 64ml 无水乙醇）
无酶双蒸水(RNase-Free ddH2O)	45 ml
无酶离心管(RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5ml)	50 个
无酶过滤柱 CS1 (Filtration Columns CS1)	50 套
无酶吸附柱 CR1 (Spin Columns CR1)	50 套

储存条件

DNase I（DNase I 冻干粉溶解于专用保存液），储存于-20℃；其他试剂室温（15-25℃）保存。

产品简介

由于植物的细胞结构和代谢活性在物种、组织类型和发育阶段之间可能存在显著差异，因此没有一种通用的裂解溶液或独特的方法可以同样适用于所有植物样品。

GF432 试剂盒所含“裂解液 RL”，是依据硫氰酸胍的原理，可用于许多植物组织，此裂解液操作简单快速，提取量稳定，可同时处理大量不同样品。本试剂盒提取的总 RNA 纯度高，基本没有基因组、蛋白和其它杂质的污染，可用于 PCR、Blot、分子克隆等多种下游实验。

对于富含淀粉、多酚和次级代谢物（如一些木本植物、胚乳、块茎以及丝状真菌的菌丝体）的植物组织，因为“裂解液 RL”加入后，会使样本变粘稠甚至凝固，建议选用另一裂解方案（产品目录号：TR02 或者 GF441）。

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℃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. 配制溶液应使用无RNase的水（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(V/V)，高压灭菌）。

使用前注意事项

1. 裂解液 RL：使用前请添加 300ul 巯基乙醇，**添加过巯基乙醇的裂解液 4℃保存**。
2. 漂洗液 PW：使用前请添加 64ml 无水乙醇。
3. 为确保 RNA 的品质及产量，应尽量收取新鲜的动物组织进行 RNA 提取，或将组织立即以液氮冷冻，储存

于-70℃，组织亦可保存在 RANstore 样本保存液（目录号：TR38）中。

操作步骤

本试剂盒**不适用于**富含淀粉、酚类和次级代谢物的植物组织（例如一些木本植物，胚乳或丝状真菌的菌丝体），因为“裂解液 RL”在加入至样本粉末后，会变固态或非常粘稠,此类植物组织请使用另一裂解方案（产品目录号：TR02）。

1. 匀浆处理

50-100mg 植物叶片在液氮中迅速研磨成粉末，加入 450ul 裂解液 RL**（使用前请先检查是否已加入 β-巯基乙醇）**，涡旋剧烈震荡混匀，并于 56℃孵育 3min。

注意 1：在 56℃孵育 1-3min 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 CS1 上(过滤柱 CS1 放在收集管中)，12,000rpm(~13,400×g)离心 2-5min，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，混匀（此时可能会出现沉淀），转至**“RNA 提取”步骤。**

4. 将所得“裂解液/乙醇混合液”（含沉淀），移取至吸附柱 CR1 中（吸附柱 CR1 放入收集管中），12,000rpm(~13,400×g)离心 30-60sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

注意：将溶液和沉淀转移至吸附柱 CR1 时，如果体积大于吸附柱容量，可以分次完成。

5. 向吸附柱 CR1 中加入 500ul 溶液 RW，12,000rpm(~13,400×g)离心离心 1min，丢弃滤液,将吸附柱 CR1 放回收集管中。

6. DNase Ⅰ降解。

每一纯化反应，请将 80ul DNA 消化液（Buffer RDD）与 10ul DNase Ⅰ 预先混合在新的离心管(轻弹或翻转离心管以混合均匀，请勿震荡)，将 90ul“DNase Ⅰ工作液”加入至吸附柱的膜中心，于室温（25-28℃）孵育 15min。

注意：如同时操作多组样本，请使用前现配新鲜的 DNase Ⅰ工作液,请勿预先配制保存 DNase Ⅰ工作液。

7. 向吸附柱 CR1 中加入 500ul 溶液 RW，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

8. 向吸附柱 CR1 中加入 600ul 漂洗液 PW**（使用前请先检查是否已加入乙醇）**，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

9. 重复操作步骤 8。

10. 12,000rpm(~13,400×g)离心 3min，将吸附柱 CR1 置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的乙醇。

注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱 CR1 在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的 RT 等实验。

11. 将吸附柱 CR1 转入一个新的 RNase-Free 离心管中，加入 30-100ul 无酶双蒸水至吸附柱的膜中心，室温静置 2min，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，得到 RNA 溶液。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 30ul，体积过小影响回收效率；RNA 溶液请于-70℃保存。