多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒

（离心柱型） / 目录号：GF441

产品内容

产品组成	GF441 / (50 preps)
裂解液 RS (Buffer RS)	30 ml(使用前加入 450ul 的巯基乙醇)
溶液 GP (Buffer GP)	10ml
溶液 BC (Buffer BC)	15 ml(使用前请先加入 30ml 无水乙醇)
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

“裂解液RS”和“DNase I”，储存于-20℃；其他试剂室温（15-25℃）保存。

产品简介

本试剂盒所含“裂解液 RS”，采用我司独特的“SDS/抗氧化”的方式，可适用于广泛的植物组织，包含草本植物与本本植物的叶片、具高粘性的多糖多酚类及种子胚乳的植物样本；此提取方案，增加了额外步骤去除多酚和多糖，RNA 的提取总量更高。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。

预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套，因为皮肤带有细菌，可能导致RNase污染;使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
2. 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4h，塑料器皿可在0.5M NaOH中浸泡10min，然后用水清洗再灭菌，即可去除RNase。
3. 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 RS：使用前请于 50℃水浴将裂解液完全回溶，并添加 450ul 巯基乙醇；**添加过巯基乙醇的裂解液 RS 继续保存于-20℃**（建议将添加过巯基乙醇的裂解液 RS 于无酶管分装成小量，再保存于-20℃）。
2. 溶液 BC：使用前请添加 30ml 无水乙醇。
3. 漂洗液 PW：使用前请添加 64ml 无水乙醇。
4. 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。
5. 凤梨和兰花推荐采用“裂解液 RL”（kit 产品目录 TR02）

操作步骤

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 RS（**使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇**），立即涡旋剧烈震荡混匀，并于 56℃孵育 5-10min，每隔一段时间可翻转混合离心管。

   注意：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. 加入 150ul 的溶液 GP 至裂解液中，混合均匀，于冰上孵育 5min，12,000rpm(~13,400×g)离心 5min。

   注意：溶液会呈现雾状，为界面活性剂、蛋白质、多糖及二次代谢物的沉淀物。

3. 移取上清液至过滤柱 CS1 上**(过滤柱 CS1 放在收集管中)**，12,000rpm(~13,400×g)离心 2min。

4. 小心吸取收集管中的上清至新的 RNase-Free 离心管中，吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。

5. 向溶液中加入 1.5 倍体积的溶液 BC**（已添加无水乙醇）**，以震荡或移液器吸吐混合均匀。

   注意：加入溶液 BC 后会形成丝状沉淀物，不影响 RNA 提取。

6. 移取混合液**(连同沉淀物一起)**至吸附柱 CR1**(吸附柱 CR1 放在收集管中)**，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，丢弃滤液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

   注意：如果混合液体积大于吸附柱容量，可以分次完成。

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

8. 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。

9. 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。

10. 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，丢弃滤液，将吸附柱 CR1 放回收集管中。

11. 重复操作步骤 10。

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

    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。

13. 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：洗脱液体积不应少于 30ul，体积过小影响回收效率。为了增加产量，可将步骤 13 得到的 RNA 溶液再加入吸附柱 CR1，放置 2min，12,000rpm(~13,400×g)离心 1min，得到 RNA 溶液。RNA 溶液-70℃中保存。

附录：从高度黏稠性的富含多酚及多糖成分的样本中提取 RNA

樟科植物样本，在裂解后粘稠度高、移取困难，可直接于过滤柱中进行裂解，以减少移液器吸取的步骤。

1. 将过滤柱 CS1 于冰上预冷，秤取不超过 30mg 的样本组织，于液氮中迅速研磨，并将研磨的样本直接转移至预冷的过滤柱 CS1 里**（过滤柱 CS1 放在收集管中）**。

2. 加入 600ul 裂解液 RS**(已添加巯基乙醇)**至过滤柱，于 60℃**金属浴**孵育 10min。

3. 12,000rpm(~13,400×g)离心 5min，将收集管中的滤液移取至新的 1.5ml 离心管，请避免吸取到沉淀物。

   注意：有些样本可能会堵塞过滤柱，可再次离心，或将管柱中剩余的裂解液移至新的过滤柱 CS1 再次离心。

4. 加入 1/3 倍体积的溶液 GP 至滤液中，混合均匀，于冰上孵育 5min，12,000rpm(~13,400×g)离心离心 5min，将上清液小心转移至新的 1.5ml 离心管，不要触碰或移取固体沉淀。转至上面“操作步骤 5”。