



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.
Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ PLANTpure 通用植物总 RNA 快速提取试剂盒
- ◆ 目录号 1133
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

PLANTpure 通用植物总 RNA 快速提取试剂盒

目录号: 1133

目录编号	包装单位
113301	20次
113302	50次

❖ 适用范围:

适用于快速提取普通植物细胞/组织高纯度总 RNA

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	20 次	50 次
裂解液 RL	4℃避光	25 ml	50 ml
去蛋白液 RE	室温	15 ml	25 ml
漂洗液 RW	室温	5 ml	10 ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	10 ml
70%乙醇	室温	4ml RNase-free H ₂ O	9ml RNase-free H ₂ O <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
RNase-free 吸附柱 RA	室温	20 个	50 个
收集管 (2ml)	室温	20 个	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温（4℃ 或者 -20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃ - 25℃）进行。裂解液 RL 可以常温运输，收到后 **4℃ 避光保存**。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ **产品介绍:**

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后总 RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ **产品特点:**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的 RL 裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
5. 有效的去除了 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。



❖ **注意事项：**

1. 第一次使用前请先在漂洗液RW瓶和70%乙醇瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
2. 裂解液RL和去蛋白液RE中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
3. 考虑到环保问题，本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，用户使用前需要自备氯仿。
4. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析RNA的质量。好的RNA产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体RNA带，分别为~5Kb(28S)，~2Kb(18S)，条带亮度比值约为2:1。有时候也可以看到~0.1kb和0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到4, 5条带也属于正常现象，如果RNA未成熟的前体或者不均一核RNA、小核RNA提取出来也可能看到介于7Kb和15Kb之间的不连续的高分子量条带。
5. 检测OD₂₆₀/OD₂₈₀吸光度比值时，RNA样品应该溶于TE后检测，如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和PH值低，会使OD₂₈₀升高，从而使比值降低。
6. 加入裂解液RL匀浆后，加氯仿前，样品可在-60℃-70℃保存一个月以上。



❖ **操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

⇒ **提示：**第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇！

1. 取1ml裂解液RL，转入1.5ml离心管中，备用。
2. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后，取60-100mg细粉转入上述装有RL的离心管，立即用手剧烈振荡20秒充分裂解（可以手动或者电动匀浆提高产量）。
3. 将匀浆样品剧烈震荡混匀，在15 -30 ℃条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。
4. **可选步骤（一般不需要）：** 12, 000rpm 离心10分钟，小心取上清转入一个新的RNase free的离心管中。当样品富含多糖或是植物的块茎部分时可能需要此额外的分离步骤。
5. 每1mlRL加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡15秒并将其在室温下孵育3分钟。
6. 于4℃12, 000rpm 离心10分钟，样品会分成三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相，RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加RL体积的60%，把水相转移到新管中，进行下一步操作。
7. 加入1倍体积70%乙醇（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），颠倒混匀（此时可能会出现沉淀）。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱RA中（吸附柱套在收集管内）。
8. 12, 000rpm 离心45秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
9. 加500μl 去蛋白液RE，12, 000rpm 离心45秒，弃掉废液。
10. 加入500μl漂洗液RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心45秒，弃掉废液。
11. 加入500μl漂洗液RW，12,000 rpm 离心45秒，弃掉废液。
12. 将吸附柱RA放回空收集管中，13,000 rpm离心2分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
13. 取出吸附柱RA，放入一个RNase free离心管中，根据预期RNA产量**在吸附膜的中**

间部位加50-80 μ l RNase free water (事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置2分钟, 12,000 rpm 离心1分钟。如果需要较多RNA, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心1分钟,或者另外再加30 μ l RNase free water, 离心1分钟, 合并两次洗脱液。

洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 RNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积最好不少于 30 μ l, 体积过小降低 RNA 洗脱效率, 减少 RNA 产量。

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
RNA 产量低	<p>*样品裂解或者匀浆不彻底-建议:液氮研磨的时候尽量研磨完全,加入裂解液 RL 后剧烈震荡或者用枪头吹打帮助裂解。加匀浆步骤可以提高产量。新鲜组织或者植物组织可以不需液氮,在干净研钵内加入适量裂解液 RL 直接研磨。</p> <p>*使用的样品或者裂解物在-20℃或者-70℃存放太久-建议:存放时间过长可能降低 RNA 产量,应尽快的处理样品或者裂解物</p> <p>*组织本身含 RNA 少-建议:不同类型的组织和细胞含有不同量的 RNA,对于含量少的组织应该适当提高起始处理量。</p> <p>*超过了吸附柱的最大吸附能力-建议:同一个样品使用多个吸附柱,然后合并得到 RNA。</p> <p>*去蛋白液 RE 和漂洗液 RW 内忘记加乙醇-建议:第一次实验时,漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇。</p>
OD260/OD280 吸光度比值<1.6	<p>*分光光度计检测吸光度时, RNA 样品不是溶于 TE, 而是溶于水。低离子浓度和低 pH 条件下, OD280 值会较高,造成比值低。-建议:检测时用 TE 稀释样品</p> <p>*污染了蛋白或者苯酚-建议:做步骤 6 吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相和下层有机相,确保做了步骤 8。</p>
下游的 RT-PCR 实验不成功	<p>*忘记做步骤 12,或者将吸附柱取出时下端碰到了收集管里面的漂洗液,造成洗脱下来的 RNA 含有乙醇,乙醇抑制了逆转录反应-建议:确保做了步骤 12,然后小心取出吸附柱,可以在空气中晾几分钟,让残留乙醇挥发。</p>



问题	评论与建议
基因组 DNA 污染	<p>*起始样品量超出了裂解液 RL 的处理范围-建议：选择合适的起始处理量。</p> <p>*样品中含有有机溶剂（如乙醇，DMSO 等），强缓冲液或碱性溶液。-建议：避免这些可以改变裂解液 RL 性质或者 PH 值的物质。</p> <p>*吸取上清时吸入了中间相-建议：做步骤 6 吸取上清水相的时候小心不要吸收到中间相。</p>
RNA 降解， 完整性不佳	<p>* RNA 提取所用各种物品和试剂没有灭活 RNA 酶-建议：按照注意事项准备 RNA 提取的各种用品。</p> <p>*组织取出后没有马上处理或冷冻，提取前已经降解-建议：组织应该尽量立刻处理，不能及时处理的应该尽快保存于液氮或者 -70°C。</p> <p>*提取的 RNA 样品没有保存在 -20°C 或 -70°C 低温-建议：尽可能的将 RNA 保存在 -70°C 的低温。</p> <p>*样品提取过程中降解-建议：提取动作应该尽可能的快，离心应该低温进行，取用 RNA 时尽量冰上进行。</p>

