

CAT#: GZ0121203-50



植物 RNA 提取试剂盒

Plant RNA Purification Kit

使用手册 V1.0

北生京泽（启东）生物科技有限公司
江苏省南通市启东市启东经济开发区林洋路 500 号
网址：www.bsgeneze.com；电话：40001-59600

💡 产品及特点

本试剂盒采用特异性结合植物 RNA 的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，满足大多数植物 RNA 提取需求，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化，可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，离心沉淀去除多糖多酚和次级代谢产物，裂解混合物用乙醇调节 RNA 结合吸附到基因组 DNA 清除柱，然后 RNA 被选择性洗脱滤过，吸附在基因组 DNA 清除柱上的残留 DNA 无法洗脱连同柱子一起丢弃从而清除掉 DNA。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离子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 H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

它具有下列特点：

1. 安全，不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤；
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 25 分钟内完成；
3. 稳定：多次柱漂洗确保高纯度，提取的 RNA 纯度高，质量稳定可靠，可适用于各种常规操作，包括 PCR/RT-PCR 等。

📋 成分规格

产品组成	GZ0121203-50
Buffer CLB	50mL
Buffer RLT Plus	25ml
Buffer RW1	40mL
Buffer RW	10 mL 第一次使用添加 42mL 无水乙醇
RNase-free H ₂ O	10 mL
基因组 DNA 清除柱和收集管	50 套
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	50 套

➤ 运输及保存

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 不合适的储存于低温 (4°C 或者 -20°C) 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°C-25°C) 进行。
2. 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。

使用方法

自备试剂

无菌水、 β -巯基乙醇、乙醇、研钵(可选)

提示 (实验前请先阅读注意事项)

- 第一次使用前请先在 Buffer RW 瓶加入指定量无水乙醇!
- 取 1ml Buffer CLB 至离心管内(如果 CLB 有析出或者沉淀需先置于 65°C 水浴重新溶解), 在 Buffer CLB 中加入 5% β -巯基乙醇 (1ml CLB 加 50 μ l β -巯基乙醇)。颠倒混匀后 65°C 水浴中预热。多个样品按照比例放大准备。

1. 直接研磨法 (实验室无液氮情况下或者柔软易研磨植物样品推荐此法):

- a. 新鲜植物组织或者冰冻保存样品称重后取 100mg-200mg (水分少的样品如叶片种子等可加 100mg-150mg, 水分多的样品如草莓西瓜果实可多加一些) 迅速剪成小块放入研钵, 加入 1ml CLB (已加有 β -巯基乙醇) 室温下充分研磨成匀浆, 注意应该迅速研磨让组织和裂解液 CLB 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

(注意: β -巯基乙醇是 Buffer CLB 的关键成分, 必要的时候可以提终浓度到 10-20%。如果特别复杂植物, 可以尝试在 CLB 中加入 PVP40 至终浓度 2%。)

- b. 将裂解物转入离心管, 立即剧烈振荡 15 秒, 短时放回 65°C 水浴中 (5-10 min), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。13, 000rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。
- c. 取裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

(注意: 若上清表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面液体即可。)

- d. 立刻接操作步骤的步骤 3。

2. 液氮研磨法（适用广泛，提取复杂难破碎，易降解样品时推荐此法）：

- a. 液氮中研磨新鲜或-70°C 冷冻的材料至细粉。
- b. 转移 100mg-200mg 细粉（水分少的样品如叶片种子等可加 100mg-150mg，水分多的样品如草莓西瓜果实可多加一些）加至预热的 Buffer CLB（已加有 β -巯基乙醇）离心管中。立即剧烈涡旋 30-60 秒或者用吸头吹打混匀裂解直得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- c. 短时放回 65°C 水浴中（5-10 min），中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。
- d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 10 分钟，沉淀不能裂解的碎片。
- e. 取裂解物上清（在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清，这样可以提高产量）转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积)，此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。

（注意：若上清表面有漂浮物，用吸头挑开吸取下面液体即可。）

- f. 立刻接操作步骤的步骤 3。

3. 将混合物(每次小于 720 μ l，多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱中，（清除柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 2 分钟，弃掉废液。

（注意：确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。）

4. 将基因组 DNA 清除柱子放在一个干净 2ml 离心管内（不用 RNase free 或者 DEPC 处理，一般干净的新离心管即可。也可使用 RNA 吸附柱配套的新的干净收集管），在基因组清除柱内加 500 μ l Buffer RLT Plus，13,000 rpm 离心 30 秒，收集滤液（RNA 在滤液中），用微量移液器较精确估计滤过液体积（通常为 450-500 μ l 左右，滤过时候损失体积应该减去），加入 0.5 倍体积的无水乙醇，此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。

5. 立刻将混合物(每次小于 720 μ l，多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 2 分钟，弃掉废液。立刻将混合物(每次小于 750 μ l，多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 2 分钟，弃掉废液。

（注意：确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。）

6. 加入 700 μ l Buffer RW1，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

7. 加入 500 μ l Buffer RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500 μ l Buffer RW，重复一遍。

8. 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。

9. 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 30-50 μ l RNase free water (事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量), 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。

10. 如果预期 RNA 产量 > 30 μ g, 加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 9, 合并两次洗液或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

(注意: 洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高, 分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%, 但是浓度要低, 用户根据需要选择。)

注意事项

- 所有的离心步骤均可在室温完成 (4 $^{\circ}$ C 离心也可以), 使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机, 如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
- 需要自备 β -巯基乙醇, 乙醇, 研钵(可选)。
- 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 处理能力, 否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时, 如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时可使用较少的样品处理量, 将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
- Buffer CLB 和 Buffer RLT Plus 和 Buffer RW1 中含有刺激性化合物, 操作时戴乳胶手套, 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。
- 关于 DNA 的微量残留:

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留 (DNase 消化也无法做到 100% 无残留), 本公司的 RNA 提取产品可清除绝大多数 DNA, 不需要 DNase 消化, 可直接用于反转录 PCR 和荧光定量 PCR。个别特殊情况如 DNA 含量过于丰富造成残留或者要进行严格的 mRNA 表达量分析荧光定量 PCR, 我们建议在进行模板和引物的选择时:

- 1) 选用跨内含子的引物, 以穿过 mRNA 中的连接区, 这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
- 2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
- 3) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后 RNA 清洁(cleanup)。
- 4) 在步骤 Buffer RW1 漂洗前, 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 柱上消化处理。

附录 1: DNA 酶柱上消化

1. 按照前面所列试剂盒操作步骤操作，直到做完操作步骤 5。
2. 取 45 μ l DNase I buffer 和 5 μ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液（处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液）。
3. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l Buffer RW1，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
4. 向吸附柱 RA 中央加入 50 μ l 的 DNase I 工作液，室温（20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C）放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上向膜四周浸润充分和膜接触，不要让工作液滴在 O 型垫圈或是离心柱管壁上挂壁或者挂在垫圈上不能充分和膜接触。
5. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l Buffer RW1，12,000 rpm 离心 30-60 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. 接着做操作步骤 7，并完成后续所有步骤。

附录 2: RNA 含量少样品或者 RNA 复杂产量低的解决方案

可以提高样品处理量到 300-500mg/2ml Buffer CLB，上清过两根基因组 DNA 清除柱子，洗脱下来的 RNA，可以两个合并到一根 RNA 吸附柱上，可以大大提高 RNA 浓度。

关联产品

产品编号	产品名称
GZ070101-500	GeneRed 核酸染料
GZ070102-500	Geneblue 核酸染料
GZ0733140	RNA 高灵敏度测定试剂盒
GZ020101-1	2 \times Taq PCR MasterMix（含染料）
GZ020701-1	2 \times Probe qPCR Mix
GZ020801-1	2 \times SYBR qPCR Mix
GZ020302-50	cDNA 第一链合成试剂盒（去除基因组）
GZ020303-50	一管式 cDNA 第一链合成试剂盒（去除基因组）



关注京泽微信公众号
了解更多产品资讯