

HiPure Plant RNA Plus Kit

多酚多糖类植物总 RNA 提取试剂盒

本产品适合于从 50~150mg 常规和多酚多糖类的植物或真菌样品中提取总 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，整个提取过程只需 20~30 分钟。试剂盒采用 DNA 过滤技术，可高效地过滤去除 DNA。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern Blot、poly A⁺纯化、核酸保护和体外翻译等实验。

产品组份

产品编号	R4150-01	R4150-02	R4150-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
TCEP (1M)	/	0.29 g	5 × 0.29 g
Buffer EP	/	1.0 ml	5.0 ml
Buffer PSL	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	6 ml	20 ml	2 × 50 ml
RNase Free Water	1.5 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品可以在室温(15~25℃)保存 18 个月，收到产品后，最好把 TCEP(干粉)保存于-20~8℃。低温下，Buffer PSL 可能会有沉淀形成，55℃水浴让沉淀完全溶解。因 RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。推荐分装并保存于 2~8℃，以减少污染。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积的无水乙醇，于室温保存。
- TCEP 的溶解：取出 TCEP(干粉)，每支加入 0.85ml Buffer EP，颠倒混匀，溶解后待用。溶解后的 TCEP 可以在 2-8°C 保存 3 个月，-20°C 保存 6 个月。TCEP，中文名为三(2-羧乙基)膦盐酸盐，是一种高效、无异味、不含硫醇基还原剂，可高效灭活核酸酶和防止多酚氧化，可代替 2-巯基乙醇，提高 RNA 的完整性和得率。
- 使用前，每 1ml Buffer PSL 中加入 20 μ l TCEP 或 50 μ l 2-巯基乙醇，以提高裂解和抗氧化能力，混合液在 2-8°C 可以放置 1 周。

实验步骤

1. **用液氮将植物或真菌研磨成粉末，称取 50-150mg 粉末至 2.0ml 离心管中。**
 - 处理易研磨植物样品(水果果实/鲜嫩叶片等)，直接转移 50~150mg 样品和 1.0ml Buffer PSL 至研钵中研磨或电动匀浆器研磨，然后转移 0.8~0.9ml 匀浆液至离心管中，按第三步进行操作。
 - 受植物样品多样性影响，且生不同生长发育阶段组织 RNA 含量差异显著，初次实验时，常规植物或多酚类样品用 100mg，富含粘液质的组织样品用 50mg 进行提取，根据实验结果调整样品用量，但最高不建议超过 150mg。
 - 研磨好的样品在称量、转移、存放或加入 PSL 之前都不能解冻，否则 RNA 会降解。加入 Buffer PSL 后要立即涡旋 10-15 秒让样品充分分散，成团样品可以用移液器吸打辅助分散，然后再进行第二个样品研磨操作。
2. **样品裂解：加入 0.9ml Buffer PSL 至样品中，立即涡旋 10~15 秒让样品充分分散。**
 - 使用前，每 1ml Buffer PSL 中加入 20 μ l TCEP 或 50 μ l 2-巯基乙醇，以提高裂解和抗氧化能力，混合液在 2-8°C 可以放置 1 周。
3. 室温下，14,000 \times g 离心 5 分钟。
4. 把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。转移~750 μ l 上清液转移至 gDNA 过滤柱中。14,000 \times g 离心 2 分钟，弃去 gDNA 过滤柱。
5. 加入 0.4 倍体积无水乙醇(~300 μ l) 至滤液中，用移液枪吸打 3~5 次。
6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。

7. **倒弃滤液**，把柱子装回收集管中。转移余下的混合液至柱子中，12,000 × g 离心 1 分钟。

若需彻底去除 DNA，建议订购 (R4911) DNase on Column Kit 进行膜上 DNase 消化，按 DNase 消化步骤进行消化。
8. **倒弃滤液**，把柱子装回收集管中。加入 700µl Buffer RW1 至柱子上。12,000 × g 离心 1 分钟。
9. **倒弃滤液**，把柱子装回收集管。加入 700µl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × g 离心 1 分钟。
Buffer RW2 在使用之前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
10. **倒弃滤液**，把柱子装回收集管。加入 700µl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。
12. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~100µl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
柱子最小的洗脱体积是 30µl，若 RNA 产量超过 30µg，推荐进行第二次洗脱。
13. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

DNase 消化步骤 (请另外订购 R4911)

1. 按上述的实验步骤第 1-7 步操作，让 RNA 结合在 HiPure RNA Mini Column 中。
2. **倒弃滤液**，把柱子装回收集管中。加入 300µl Buffer RW1 至柱子上。12,000 × g 离心 2 分钟。倒弃滤液，把柱子装回收集管。
3. 在 1.5ml 离心管配制 DNase I 混匀液：80µl DNase 和 10µl DNase I，混匀。
4. 把 DNase 混匀液全部滴加到柱子的膜中央，室温(15-30°C)静置 15~20 分钟消化去除 DNA。
5. 加入 600µl Buffer RW1 至柱子上，静置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
6. **倒弃滤液**，把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × g 离心 1 分钟。
7. **倒弃滤液**，把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × g 离心 1

分钟。

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。
9. 将 RNA 柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~80µl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 1 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 20µl，若 RNA 产量超过 30µg，推荐进行第二次洗脱。本产品只回收 >200nt 的 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA 和 tRNA 等，在纯化过程中被去掉，可起到富集 mRNA 的作用。
10. 弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量，超量样品反而会降低产量和纯度。由于植物样品的复杂性，降低样品量至 30~50mg。
- **裂解液离心不充分：**加大裂解液的用量，延长裂解液的离心时间以去除高分子量杂质。

2. RNA 产量低

- **洗脱不充分：**RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置几分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。

3. RNA 降解

- **RNase Free Water 被污染：**RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的 RNase Free Water 或 DEPC 处理水。
- **样品贮藏问题：**反复解冻会引起 RNA 降解，确保样品解冻次数不要超过 2 次。
- **裂解问题：**液氮研磨后不要让样品解冻，快速加入裂解液并立即打散样品。样品只能充分裂解打散后，内源的核酸酶才能被灭活，RNA 才不会降解。
- **电泳原因：**常见的 RNA 降解现象都是电泳过程中引起的。更换新的 Loading Buffer 和电泳缓冲液。