

HiPure HP Plant RNA Mini Kit

难提植物总 RNA 小提试剂盒

本产品适合于从难提取植物样品（果实和种子）中提取高纯度总 RNA。试剂盒结合了两种高效的 RNA 抽提技术，将一步法的 RNA 抽提技术和硅胶柱 RNA 纯化技术结合起来，可最大程度提高 RNA 的纯度。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	R4165-01	R4165-02	R4165-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
DNase I	120 μ l	600 μ l	5 x 600 μ l
DNase Buffer	1 ml	15 ml	60 ml
Buffer PAL	12 ml	60 ml	250 ml
Buffer GXP2	6 ml	20 ml	100 ml
Buffer BDP	12 ml	60 ml	250 ml
Buffer GW1	13 ml	22 ml	88 ml
Buffer RVV2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

版本号：2023-12-08

保存条件

本产品除 DNase I 和 Buffer BDP 外，其它组份可在室温保存 18 个月。DNase I 和 Buffer BDP 低温运输，收到产品后，把 DNase I 保存于-20~8℃，Buffer BDP 保存于 2~8℃。

版本升级说明

为进一步提升 RNA 产物的 A260/230 比值，本次产品升级将含异硫氰酸胍的 Buffer RW1 升级为含盐酸胍的 Buffer GW1，并建议用 0.5 倍无水乙醇代替 Buffer GXP2 来提升 A260/230。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积的无水乙醇，于室温保存
- 在 Buffer GXP2 中，加入 1.5 倍体积无水乙醇，于室温保存
- 在 Buffer GW1 中，按标签所示，加入无水乙醇，于室温保存
- (可选) 2-巯基乙醇
- (可选) PVP-40
- (可选) 氯仿或酚氯仿

实验步骤

1. 用液氮将植物或真菌磨成粉末，称取 50-150mg 粉末至 2.0ml 离心管中。立即加入 0.8ml Buffer PAL/2-巯基乙醇至样品中，剧烈涡旋打散样品，65℃放置 5~10 分钟。处理易研磨的植物样品(水果果实/鲜嫩叶片等)，转移 100~150mg 样品至研钵中，加入 1ml Buffer PAL/2-巯基乙醇至研钵中，立即进行充分的研磨，然后转移 0.8ml 匀浆液至 2.0ml 离心管中，65℃放置 5~10 分钟，按第 2 步进行操作。
- Buffer PAL 使用前，加入 2-巯基乙醇至 1%(V/V)，难提样品可以提高至 5%。处理复杂的

多酚类样品，使用前还可以加入 PVP-40 至 Buffer PAL，终浓度为 2%(W/V)，以提升裂解液的抗氧化能力。大部分样品不需要加入 PVP-40 和巯基乙醇。由于 2-巯基乙醇和 PVP-40 不稳定，添加后的 Buffer PAL 室温放置时间不要超过 1 周。

- 若下游应用对 DNA 污染极为敏感，建议富含 DNA 样品(如嫩芽，嫩叶、根等)，组织用量不要超过 50mg，大量 DNA 会造成 DNase I 消化不完全。

2. **加入 800 μ l Buffer BDP (或氯仿、或酚氯仿) 至裂解液中，高速涡旋 10 秒。室温下，13,000 \times g 离心 10 分钟。**

- Buffer BDP 为氯仿代替物，主要成分为更低毒性的溴氯丙烷。部分样品用氯仿抽提好于 Buffer BDP 抽提，若您初次提取失败后，你可以尝试用氯仿或酚氯仿代替 Buffer BDP。Buffer BDP、氯仿或酚氯仿与皮肤接触时，立即脱去污染衣着，用大量流动清水冲洗，严重时就医处理。
- 富含多糖和蛋白的难提组织样品，用酚氯仿（货号 C493）进行等体积抽提可以更高效去除多糖和其它杂质。从复杂样品中提取 miRNA 时，建议这一步用酚氯仿进行抽提。

3. **转移~600 μ l 上清液至新离心管中，加入 1.5 倍体积 Buffer GXP2 或 0.5 倍无水乙醇，涡旋 10 秒。**

加入结合液时，若产生明显絮状物，用移液枪吸打打散絮状物。若产生大量絮状物，可能是因为样品富含多糖类物质，重新提取时，样品量要减半使用以避免堵塞柱子。

- 用 0.5 倍无水乙醇作为结合液时，可以提高 A260/230 比值。初次实验，推荐使用 0.5 倍乙醇作为结合液。
- 用 1 倍异丙醇作为结合液时，可以提取得到 miRNA，但处理富含多糖样品时，加入等倍异丙醇作为结合液时可能会导致提取失败。
- 加入 Buffer GXP2(已用乙醇稀释)作为结合液时，产量是最高的，但也会造成 A260/230 比值下降。

5. **把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积混合液(含沉淀)至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。**

6. **倒弃滤液，把柱子装回收集管中，转移余下的混合液(含沉淀)至柱子。12,000 \times g 离心 30~60 秒。**

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 250 μ l Buffer RW2 至柱子中，12,000 \times g 离心 1 分钟。倒弃滤液，把柱子装回收集管。

倒弃滤液时，小心取出柱子，不要让柱子底部碰到液体，若碰到液体再离心一次。

8. 按下表在 1.5ml 离心管中，配制 DNase I 反应液，吸打混匀 2-3 次。

成分	用量（每人份）
DNase I	10 μ l
DNase Buffer	90 μ l

9. 把全部的 DNase I 反应液滴加到柱子膜中央，盖上盖子，正放 2 分钟，然后再把柱子反放于桌面，让 DNase 反应液尽量覆盖于膜的表面（大部分的 DNA 在膜表面），室温静置 15~20 分钟消化去除 DNA。
10. 加入 600 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中，室温放置 2 分钟，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000 \times g 离心 30~60 秒。
13. 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 \times g 离心 2 分钟。
14. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~100 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
15. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。