

Trelief® RNAPrep Pure Plant Plus Kit (Polysaccharides & Polyphenolics-rich) RNAPrep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(离心柱型)

■ 目录号

TSP412

■ 产品简介

本试剂盒可从植物组织,尤其是富含多糖多酚或淀粉的植物组织(如棉花叶片、成熟水稻叶片、拟南芥种子、白松松针、香蕉、枇杷叶片、马铃薯块茎、苹果、梨、西瓜果肉、猕猴桃、月季、烟草、沙棘、百合等)中快速提取总RNA,可同时处理大量不同样品。提取的总RNA纯度高,无基因组、蛋白和其它杂质的污染,可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、Poly A筛选、体外翻译、RNase保护分析和分子克隆等多种下游实验。

■ 产品组成

组分	规格(50次)	保存条件及稳定性
Buffer SL(裂解液)	30 mL	15~25°C保存1年,加入β-巯基乙醇后2~8°C保存1个月

Buffer RW1(去蛋白液)	40 mL	15~25°C保存1年
Buffer RW(漂洗液)	12 mL	15~25°C保存1年,加入无水乙醇后可储存6个月
RNase-Free ddH ₂ O	15 mL	15~25°C保存1年
RNase-Free Columns CR3(吸附柱)	50 个	15~25°C保存1年
RNase-Free Columns CS(过滤柱)	50 个	15~25°C保存1年
Collection Tubes(2 mL收集管)	50×2个	15~25°C保存1年
RNase-Free Centrifuge Tubes(1.5 mL离心管)	50 个	15~25°C保存1年
RNase-Free DNase I(1500 U)	1 支	2~8°C保存1年
Buffer RDD(DNA消化缓冲液)	4 mL	2~8°C保存1年
RNase-Free ddH ₂ O	1 mL	2~8°C保存1年

■ 注意事项及准备

· 预防RNase污染,应注意以下方面

- 1) 经常更换新手套。皮肤经常带有细菌、汗液及RNase等,可能导致RNA降解。
- 2) 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
- 3) RNA在Buffer SL中不会被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,塑料或玻璃器皿可通过固相RNase清除剂(目录号:TSP005)浸泡处理以去除RNase。
- 4) 配制溶液应使用RNase-Free ddH₂O(将水加入干净的玻璃瓶中,加DEPC至终浓度为0.1%(V/V),混匀放置过夜后高压灭菌)。

· 使用前应注意以下方面

- 1) 操作前在Buffer SL中加入β-巯基乙醇(自备)至终浓度5%,如475 μL Buffer SL中加入25 μL β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的Buffer SL 4°C可放置一个月,Buffer SL在储存时可能会形成沉淀,若有沉淀出现,请加热溶解后使用。
- 2) 第一次使用前应在Buffer RW中加入无水乙醇,加入量请参见瓶上标签。

· RNA得率

植物样本(100 mg)	总RNA得量(μg)
棉花叶片	~25
拟南芥种子	~40
香蕉果肉	~5

· DNase I储存液的配制

DNase I干粉(1500 U)在瓶壁形成一层薄膜,可能观察不到,不打开瓶盖,直接使用RNase-Free注射器(自备)将550 μL RNase-Free ddH₂O注射进瓶中,轻柔的颠倒混匀(勿涡旋振荡),使DNase I完全溶解后,用RNase-Free注射器吸出溶液,分装后-25~-15°C贮存(可保存9个月)。也可将RNase-Free ddH₂O直接加入瓶中,请小心打开瓶盖,防止DNase I损失。

注:溶解后的DNase I溶液中可能会出现不溶物,这是正常现象,对DNase I的活性和生化指标没有影响。从-20°C融化后的DNase I储存液保存于2~8°C(可保存6周),切勿再次冻存。

■ 操作步骤(实验前请先阅读注意事项)

以下操作如非指明,均在室温下进行。

1. 匀浆处理:取50~100 mg植物叶片或果实果肉,于液氮或低温研磨仪中迅速研磨成粉末,加入500 μL Buffer SL(使用前请先检查是否已加入β-巯基乙醇),立即涡旋充分震荡混匀。

注:对于预期RNA得率小于10 μg的植物样本,请使用100 mg的起始样本量;对于富含淀粉的样本或成熟叶片,请将Buffer SL用量增加至700 μL;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. 12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min。

3.将上清液转移至过滤柱CS上(过滤柱CS放在收集管中),12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min,小心吸取收集管中的上清至新的RNase-Free的离心管中,吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。

4.缓慢加入0.4倍上清体积的无水乙醇,混匀(此时可能会出现沉淀),将得到的溶液和沉淀一起转入RNase-Free Columns CS(以下简称吸附柱CR3)中(吸附柱CR3放在收集管中),12,000 rpm(~13,400×g)离心15 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CR3放回收集管中。

注:如果上清液体积有损失,请相应调整乙醇的加量。

5.向吸附柱CR3中加入350 μL去Buffer RW1,12,000 rpm(~13,400×g)离心15 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CR3放回收集管中。

6. DNase I 工作液的配制:取10 μL DNase I 储存液放入新的RNase-

Free离心管中,加入70 μL Buffer RDD,轻柔混匀。

7.向吸附柱CR3中央加入80 μL的DNase I 工作液,室温放置15 min。

8.向吸附柱CR3中加入350 μL Buffer RW1,12,000 rpm(~13,400×g)离心15 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CR3放回收集管中。

9.向吸附柱CR3中加入500 μL Buffer RW(使用前请先检查是否已加入无水乙醇),12,000 rpm(~13,400×g)离心15 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CR3放回收集管中。

10.重复步骤9。

11.12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min,倒掉废液。将吸附柱CR3置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

12.将吸附柱CR3放入新的RNase-Free离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加30-50 μL RNase-Free ddH₂O,室温放置2 min,12,000 rpm(~13,400×g)离心1 min,得到RNA溶液。

注:洗脱时RNase-Free ddH₂O体积不应少于30 μL,体积过小影响回收效率。RNA样品请在-80°C中保存。如果希望提高RNA得率,可将步骤12中离心得到的RNA溶液再加入吸附柱CR3中,室温放置2min,12,000 rpm(~13,400×g)离心1 min,得到RNA溶液。

■ RNA完整性及纯度检测

• **完整性:**通常情况下, RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳检测完整性。如果28S和18S条带明亮、清晰、条带锐利(条带的边缘清晰),并且28S的亮度在18S条带的两倍以上,我们认为RNA的质量较好,否则表示RNA出现降解。出现弥散片状或条带消失表明RNA严重降解。

• 纯度:

A ₂₆₀	核酸最大吸收峰
A ₂₈₀	蛋白质最大吸收峰
A ₂₃₀	其他杂质(多糖、胍盐等)吸收峰

当 $1.8 < A_{260}/A_{280} < 2.1$ 时,表明RNA较纯且没有蛋白质污染,当 $A_{260}/A_{280} > 2.2$ 时,表明RNA已水解为单核苷酸。

■ 保存条件

保质期1年,试剂盒各组分保存条件见产品组成。

■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议,欢迎随时与我们联系: product@tsingke.com.cn。

