

## Trelief® RNAPrep Pure Plant Kit

### RNAPrep Pure植物总RNA提取试剂盒(离心柱型)

#### ■ 目录号

TSP411

#### ■ 产品简介

本试剂盒可从植物组织中快速提取总RNA,且可同时处理大量不同样品。提取的总RNA纯度高,无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、PolyA 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 RL(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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 RL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。玻璃器皿可在150°C烘烤4 h,塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min,然后用水彻底清洗,再灭菌,即可去除RNase,也可通过固相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 ddH<sub>2</sub>O(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 RL中加入β-巯基乙醇(自备)至终浓度1%,如1 mL

Buffer RL中加入10 μL β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的Buffer RL中4°C可放置一个月,Buffer RL在储存时可能会形成沉淀,如果有沉淀出现,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,加入量请参考瓶上标签。

##### • RNA得率

植物样本(100 mg)	总RNA得量(μg)
拟南芥	~35
玉米	~25
西红柿	~65
烟草	~60

##### • 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 ddH<sub>2</sub>O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 ddH<sub>2</sub>O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植物叶片在液氮中迅速研磨成粉末,加入450  $\mu$ L Buffer RL (使用前请先检查是否已加入 $\beta$ -巯基乙醇),涡旋充分震荡混匀。

**注:在56°C孵育1~3 min将有助于植物组织裂解,但对于某些富含淀粉的样品,请不要加热处理,防止因淀粉引起的样品膨胀现象;由于植物多样性非常丰富,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,可根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。**

2. 将所有溶液转移至RNase-Free Columns CS (以下简称过滤柱CS)上(过滤柱CS放在收集管中),12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心2~5 min,小心吸取收集管中的上清至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。

**注:裂解液较粘稠,将溶液转移至过滤柱时,可以剪去部分吸头末端。**

3. 缓慢加入0.5倍上清体积的无水乙醇(通常为225  $\mu$ L),混匀(此时可能会出现沉淀)后,将得到的溶液和沉淀一起转入RNase-Free Columns CR3 (以下简称吸附柱CR3)中,12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心30~60 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。**

4. 向吸附柱CR3中加入350  $\mu$ L去Buffer RW1,12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心30~60 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CR3放回收集管中。

5. DNase I工作液的配制:取10  $\mu$ L DNase I储存液放入新的RNase-Free离心管中,加入70  $\mu$ L Buffer RDD,轻柔混匀。

6. 向吸附柱CR3中央加入80  $\mu$ L的DNase I工作液,室温放置15 min。

7. 向吸附柱CR3中加入350  $\mu$ L去Buffer RW1,12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心30~60 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CR3放回收集管中。

8. 向吸附柱CR3中加入500  $\mu$ L Buffer RW (使用前请先检查是否已加入乙醇),室温静置2 min,12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心30~60 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CR3放回收集管中。

9. 重复步骤8。

10. 12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ 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。

**注:此步骤目的是将吸附柱CR3中残余的漂洗液去除,漂洗液的残留,可能会影响后续的反转录等实验。**

11. 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30~100  $\mu$ L RNase-Free ddH<sub>2</sub>O,室温放置2 min,12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心2 min,得到RNA溶液。

**注:洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu$ L,体积过小影响回收效率。RNA样品请在-80°C中保存。**

## ■ 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。

