

Superbrilliant[®]多糖多酚/复杂植物 RNA 快速提取试剂盒**Superbrilliant[®] Polysaccharide polyphenols / complex plant
RNA rapid extraction kit****Cat.No.:ZS-M11020****组分**

编号	组分	ZS-M11020 (50T)
101026	Solution PR1	50ml
101027	Solution PR2	25ml
101028	Solution PR3	40ml
101029	Washing Buffer RW	52ml
103006	RNase Free H ₂ O	10ml
101030	DNA 清除柱和收集管	50 套
101031	RNase Free 吸附柱和收集管	50 套

储存:

- 1.室温下 (15°C–25°C) 储存。
- 2.避免试剂长时间暴露于空气中, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

简介: 本公司在无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上, 又独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留, 得到的 RNA 不需要 DNase 消化, 可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。本试剂盒可从植物组织, 特别是富含多糖多酚的植物组织中快速提取总 RNA, 可同时处理大量不同样品。独特的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, RNA 被选择性洗脱过滤, 吸附在基因组 DNA 清除柱上的 DNA 无法洗脱连同柱子一起丢弃去除 DNA。RNA 用乙醇调节结合条件后, 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过快速的漂洗-离心的步骤, 将细胞代谢物, 蛋白等杂质去除。低盐的 RNase Free H₂O 可将 RNA 从硅基质膜上洗脱下来。

注意事项:

- 1.所有的离心步骤均可在室温完成, 使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机, 如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
- 2.需要自备β-巯基乙醇, 乙醇, 研钵(可选)。
- 3.样品处理量不要超过 DNA 清除柱和 RNA 吸附柱的处理能力。开始摸索实验条件时, 可使用较少的样品处理量, 根据试验情况增加或者减少样品处理量。
- 4.Solution PR1 和 Solution PR2 和 Solution PR3 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。
- 5.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 I 消化也无法做到 100%无残留), 本公司的 RNA 提取产品, 采取了本公司独特的缓冲体系和 DNA 清除柱技术, 绝大多数 DNA 已经被清除, 不需要 DNase I 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:
 - a.选用跨内含子的引物, 以穿过 mRNA 中的连接区, DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
 - b.选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
 - c.将 RNA 提取物用 RNase Free 的 DNase I 处理。
 - d.在 Solution PR3 漂洗前, 直接在 RNase Free 吸附柱上进行 DNase I 柱上消化处理。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

前期准备:取 1ml Solution PR1 于离心管内(如果 Solution PR1 有析出或者沉淀需先置于 65°C 水浴直至溶液澄清), 在 Solution PR1 中加入 β -巯基乙醇(1ml Solution PR1 加 50 μ l β -巯基乙醇)。颠倒混匀后 65°C 水浴中预热。多个样品则按照比例放大准备。

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 Solution PR1 (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 Solution PR1 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。(β -巯基乙醇是 Solution PR1 的关键成分, 必要的时候可以提高终浓度到 10-20%。如果特别复杂植物, 可以尝试在裂解液中加入 PVP40 至终浓度为 2%。)

b.将裂解物转入离心管, 立即剧烈振荡 15 秒, 放回 65°C 水浴中 5-10min, 期间颠倒 1-2 次帮助裂解。13000rpm 离心 10 分钟。

c.取上清到一个新 1.5ml 离心管。加入上清体积一半的无水乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响实验, 应立即吹打混匀。取上清时表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面清澈液体即可。

d.立刻进行操作步骤的步骤 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) 到 Solution PR1 (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, 降低粘稠度和提高产量。

c.放回 65° C 水浴中 (5-10min), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。

d.将裂解物 13,000rpm 离心 10 分钟。

e.取上清转到一个新 1.5ml 离心管。加入上清体积一半的无水乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀。取上清时表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面清澈液体即可。

f.立刻进行操作步骤的步骤 3。

3.将混合物(每次小于 720 μ l, 可以多次加入)加入 DNA 清除柱中, 清除柱放入收集管中, 13,000rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。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（不需 RNase Free 或者 DEPC 处理，一般干净的新离心管即可。），在 DNA 清除柱内加 500 μ l Solution PR2，13,000rpm 离心 30 秒，收集滤液（RNA 在滤液中），加入 0.5 倍体积的无水乙醇(通常为 450-500 μ l 左右)，此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀。
- 5.立刻将混合物(每次小于 720 μ l，可以分多次加入)加入一个 RNase Free 吸附柱中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm 离心 2 分钟，弃掉废液。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 700 μ l Solution PR3，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
- 7.加入 500 μ l Washing Buffer RW，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。重复一次。
- 8.将 RNase Free 吸附柱放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液。
- 9.取出 RNase Free 吸附柱，放入一个 RNase Free 离心管中，在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l RNase Free H₂O（事先 70-90 $^{\circ}$ C 预热可提高产量），室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。
- 10.要提高 RNA 产量，可再加 30-50 μ l RNase Free H₂O 重复步骤 9，合并两次洗液，或者将第一次的洗脱液加回到吸附柱重复洗脱一遍。洗脱两遍的 RNA 浓度高,分两次洗脱合并 RNA 产量比前者高 15-30%,但是浓度要低,用户可根据需要选择。