

Biomarker Plant Total RNA Isolation Kit (Polysaccharides&Polyphenolics-rich)

◆ 产品介绍

本试剂盒可以从植物组织，特别是富含多糖多酚或淀粉的植物组织（如成熟水稻叶片，棉花叶片，拟南芥种子，香蕉，马铃薯块茎，苹果，西瓜果肉，猕猴桃，梨，月季，烟草，沙棘，百合等）中快速提取总RNA，同时可以处理大量不同样品。本试剂盒适用于快速提取植物组织细胞总RNA，结合高效基因组DNA清除技术可有效清除电泳可见gDNA残留，提取的总RNA纯度高，没有基因组、蛋白和其它杂质的污染，可用于RT-PCR、qPCR、普通转录组测序、全长转录组测序等多种下游实验。

◆ 试剂盒组成：

试剂盒组成	保存	50次
裂解液 CLB	室温	50ml
裂解液 RLT Plus	室温	25ml
去蛋白液RW1 (Buffer RW1)	室温	40ml
漂洗液RW (Buffer RW)	室温	10ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10ml
基因组 DNA 清除柱和收集管	室温	50套
RNase-free吸附柱RA和收集管	室温	50套

本试剂盒可在室温储存12个月不会影响使用效果

◆ 注意事项：

- 1.不适合储存于低温环境（4℃或者-20℃），低温会造成溶液中部分成份沉淀析出，影响使用效果，因此运输和储存均需在室温下（15℃—25℃）进行。
- 2.避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。
- 3.所有的离心步骤均可在室温完成（4℃离心也可以），使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C或者类似离心机。
- 4.第一次使用前请先在漂洗液RW瓶加入42ml无水乙醇！
- 5.样品处理量绝对不要超过基因组清除柱DA和RNA吸附柱RA处理能力，否则造成DNA残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品DNA/RNA含量时可先使用较少的样品（100mg左右）测试提取效果，再根据样品提取情况增加或者减少取样量。
- 6.裂解液CLB和RLT Plus和去蛋白液RW1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。
- 7.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消化也无法做到100%无残留），本公司的提取产品采取了独特的缓冲体系和基因组DNA清除柱技术，绝大多数DNA已经被清除，不需要专门的DNase消化，可直接用于反转录PCR和荧光定量PCR等下游实验。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，我们建议在模板和引物的选择时：
 - 1) 选用跨内含子的引物，以穿过mRNA中的连接区，这样DNA就不能作为模板参与扩增反应。
 - 2) 选择基因组DNA和cDNA上扩增的产物大小不一样的引物对。
 - 3) 将RNA提取物用RNase-free的DNase I处理。
 - 4) 在步骤去蛋白液RW1漂洗前，直接在吸附柱RA上进行DNase I柱上消化处理。

操作说明:

需要自备 β -巯基乙醇, 取1ml裂解液 CLB 至离心管内(如果 CLB 有析出或者沉淀需先置于 65°C 水浴中使析出或沉淀物重新溶解), 在裂解液 CLB 中加入 5% β -巯基乙醇(1ml CLB 加 50 μ l β -巯基乙醇)。颠倒混匀后 65°C 水浴中预热。多个样品可按照此比例放大准备。

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 CLB(已加有 β -巯基乙醇)室温下通风橱内充分研磨成匀浆,(有条件的实验室可以使用匀浆仪匀浆裂解。取适量组织加入 RNase free 1.5ml 离心管内, 加入 200 μ l 提前配置好的裂解液, 充分匀浆裂解, 补充裂解液至 1ml 立即振荡混匀)注意应该迅速研磨让组织和裂解液 CLB 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

β -巯基乙醇是裂解液 CLB 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 2%。

b. 将裂解物转入离心管, 立即剧烈振荡 15 秒, 短时放回 65°C 水浴中(5-10 min), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。13,000rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。

c. 取裂解物上清(在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量)转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。若上清表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面液体即可。

d. 立刻接操作步骤的步骤 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)至提前预冷的无菌 2.0ml 离心管中, 加入提前配置好、预热好的裂解液。立即剧烈涡旋 30-60 秒或者用吸头吹打混匀裂解直得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。

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

d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。

e. 取裂解物上清(在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量)转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。若上清表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面液体即可。

f. 立刻接操作步骤的步骤 3。

3. 将混合物(每次小于 720 μ l, 多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱中, (清除柱放入收集管中) 13,000 rpm 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 清除柱放在一个干净 2ml 离心管内(不用 RNase free 或者 DEPC 处理, 一般干净的新离心管即可。也可使用 RNA 吸附柱配套的新的干净收集管), 在基因组清除柱内加 500 μ l 裂解液 RLT Plus, 13,000 rpm 离心 30 秒, 收集滤液(RNA 在滤液中), 用微量移液器较精确估计滤过液体积(通常为 450-500 μ l 左右, 滤过时候损失体积应该减去), 加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

5. 立刻将混合物(每次小于 720 μ l, 多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 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 去蛋白液 RW1, 室温放置 1 分钟, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃

掉废液。特殊情况 DNA 含量过于丰富造成有DNA污染的：加350ul蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液，加入DNase I柱上消化处理；加350ul蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

7. 加入 500 μ l 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇!)，13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液RW，重复一遍。
8. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
9. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l RNase free H₂O (事先在 70-90°C 水浴中加热可提高产量)，室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。
10. 如果预期 RNA 产量>30 μ g，加 30-50 μ l RNase free H₂O 重复步骤 9，合并两次洗液，或者使用第一次的洗脱液重新加回到吸附柱重复洗脱一次(可提高RNA浓度)。洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高,分两次洗脱合并洗脱液的RNA产量比前者高15 - 30%，但是浓度低,用户根据需要进行选择。

◆ 附录：RNA 含量少样品或者次级代谢产物复杂RNA产量低的解决方案

可以提高样品处理量到300-500mg/2ml裂解液CLB，上清过两根基因组DNA清除柱子，洗脱下来的 RNA 溶液，可以两个合并到一根 RNA 吸附柱上，可以大大提高 RNA 浓度和总量。

◆ RNA纯度及浓度检测

完整性：RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳(电泳条件：胶浓度1.0%；0.5×TBE电泳缓冲液；180V，20 min)检测完整性。由于细胞中70-80%的RNA为rRNA，电泳后UV下应能看到非常明显的rRNA条带。rRNA大小分别约为3.7kb和1.9kb，分别对应于25S和18S rRNA；植物叶片中由于含有大量的叶绿体rRNA，可见4条或更多 rRNA条带。植物RNA样品中最大rRNA条带亮度应为次大rRNA条带亮度的1.5-2.0倍，否则表示RNA样品有一定程度的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度：OD260/OD280比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA，OD260/OD280读数在1.8-2.1之间，比值为2.0是高质量RNA的标志。OD260/OD280读数受测定所用溶液的pH值影响。同一个RNA样品，假定在10 mM Tris, pH7.5溶液中测出的OD260/OD280读数1.8-2.1之间，在水溶液中所测读数则可能在1.5-1.9之间，但这并不表示RNA不纯。

浓度：取一定量的 RNA 提取物，用RNase-Free ddH₂O稀释n 倍，用 RNase-Free ddH₂O将分光光度计调零，取稀释液进行OD260, OD280测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：终浓度 (ng/ μ l) = (OD260) × (稀释倍数n) × 40。