

## 植物 RNA 提取试剂盒 (DNase I)

项目号: R669988

储存条件: -20℃。

## 产品内容

组分	50T
DNase I	1000U
10×Reaction Buffer	1000 μ l
Buffer RL	35ml
Buffer RLC	35ml
Buffer RW1	40ml
Buffer RW2 (concentrate)	11ml
RNase-Free Water	10ml
Spin Columns FL with Collection Tubes	50
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	50

## 产品简介

本试剂盒用于从各种植物中提取纯化高品质总 RNA, 也适用于真菌菌丝 RNA 的提取。独特的分离柱, 用于匀质化和过滤高粘度的植物或真菌裂解物, 同时采用硅基质膜吸附 RNA 进行纯化, 使多聚糖等各种污染物通过洗涤被有效去除, 经洗脱的 RNA 可直接用于各种下游实验。由本试剂盒提取 RNA 分子量大于 200 碱基, 纯度高, 几乎无 DNA 残留。如果是对微量 DNA 非常敏感的 RNA 实验, 残留的 DNA 可利用无 RNase 的 DNase 在柱上进行消化去除。提取的 RNA 可用于 Northern Blot、Dot Blot、RT-PCR 和体外翻译等实验。

**自备试剂:** β-巯基乙醇、无水乙醇 (新开封或提取 RNA 专用)。

## 实验前准备及重要注意事项

1. 预防 RNase 污染, 应注意以下几方面:
  - 1) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头, 避免交叉污染。
  - 2) 配制溶液应使用无 RNase 的水。
  - 3) 操作人员戴一次性口罩和手套, 实验过程中要勤换手套。
2. 预防 RNase 污染, 应注意以下几方面:
  - 1) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头, 避免交叉污染。

- 2) 玻璃器皿应在使用前于 180°C 高温下干烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟, 用水彻底冲洗后高压灭菌。
- 3) 配制溶液应使用无 RNase 的水。
- 4) 操作人员戴一次性口罩和手套, 实验过程中要勤换手套。
3. 提取的样品避免反复冻融, 否则影响 RNA 提取的量和质量。
4. Buffer RL 在使用前请加入  $\beta$ -巯基乙醇, 1ml Buffer RL 加 10  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。加入  $\beta$ -巯基乙醇的 Buffer RL 室温可保存 1 个月。Buffer RLC 使用时不需加  $\beta$ -巯基乙醇。
5. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在 Buffer RW2 中加入无水乙醇。
6. Buffer RL 和 Buffer RLC 如果产生沉淀, 请加热使其溶解后室温放置。
7. 所有离心步骤均在室温下进行, 且所有操作步骤动作要迅速。

## 操作步骤

1. 50-100mg 植物组织在液氮中迅速研磨成粉末, 加入 600  $\mu$ l Buffer RL (使用前检查是否加入  $\beta$ -巯基乙醇) 或 Buffer RLC。涡旋振荡使其充分裂解。

注意: 1) Buffer RL 主要成分为异硫氰酸胍, 适用于大多数植物组织的裂解。但有些植物组织 (如玉米的胚乳), 由于次级代谢产物较特殊, 异硫氰酸胍使样品产生沉淀, 导致 RNA 提取效果不佳, 此时可加入 Buffer RLC 替代 Buffer RL。

2) 56°C 孵育 1-3 分钟有助于组织的裂解, 但是淀粉含量高的植物不要进行高温孵育。

2. 将步骤 1 所得全部液体转移至已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns FL) 中, 12,000 rpm ( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 2 分钟, 将收集管中的上清液转移到一个新的离心管 (自备) 中。

注意: 1) 在吸取液体时可以将枪头尖端剪掉, 便于取样。

2) Spin Columns FL 可以除去大部分的碎片, 但仍会有小部分流出, 离心后会在收集管内形成沉淀, 在进行下一步时注意避免吸到沉淀。

3. 在步骤 2 所得干净的裂解液中加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 迅速混匀。

注意: 加入乙醇后可能会产生沉淀, 但不影响后续试验。

4. 将上步得到的溶液转移到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns RM) 中, 若一次不能将全部溶液加入吸附柱中, 请分两次转入 12,000 rpm 离心 15 秒, 弃掉废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

5. 向吸附柱中加入 350  $\mu$ l Buffer RW1, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

6. 配制 DNase I 混合液: 取 52  $\mu$ l RNase-Free Water, 向其中加入 8  $\mu$ l 10 $\times$  Reaction Buffer 和 20  $\mu$ l DNase I (1U/ $\mu$ l), 混匀, 配制成终体积为 80  $\mu$ l 的反应液。

7. 向吸附柱中直接加入 80  $\mu$ l DNase I 混合液, 20-30°C 孵育 15 分钟。

8. 向吸附柱中加入 350  $\mu$ l Buffer RW1, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入 500  $\mu$ l Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 15 秒, 弃废液。

10. 重复步骤 9。

11. 将吸附柱放回收集管中, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干吸附柱中的无水乙醇。

注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除, 乙醇残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。

12. 将吸附柱装入新的离心管中, 向吸附膜的中间加入 30-50  $\mu$ l RNase-Free Water, 室温放置 1 分钟,

12,000 rpm 离心 1 分钟, 得到的 RNA 溶液保存在 -70°C, 防止降解。

注意: 1) RNase-Free Water 体积不应小于 30  $\mu$ l, 体积过小影响回收率。

2) 如果要提高 RNA 的产量, 可用 30-50  $\mu$ l 新的 RNase-Free Water 重复步骤 12。

3) 如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 12。