

HiPure HP Plant RNA Mini Kit

难提植物总 RNA 小提试剂盒

本产品适合于从难提取植物样品（果实和种子）中提取高纯度总 RNA。试剂盒结合了两种高效的 RNA 抽提技术，将一步法的 RNA 抽提技术和硅胶柱 RNA 纯化技术结合起来，可最大程度上提高 RNA 的纯度。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern Blot、poly A⁺纯化、核酸保护和体外翻译等实验。

产品组份

产品编号	R4165-01	R4165-02	R4165-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
DNase I	120 μ l	600 μ l	5 x 600 μ l
DNase Buffer	1 ml	6 ml	30 ml
Buffer PAL	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer GXP2*	6 ml	20 ml	100 ml
Buffer RW1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品除 DNase I 外，其它组份可在室温保存 18 个月。DNase I 采用室温运输，收到产品后，把 DNase I 保存于-20~8℃。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积的无水乙醇，于室温保存
- Buffer GXP2 使用前加入 1.5 倍体积无水乙醇，于室温保存
- (可选) 2-巯基乙醇
- (可选) PVP-40

实验步骤 A

该方案适合于从各种植物/真菌样品中提取 RNA，特别是复杂难提取的植物样品（如葡萄叶片/茶叶）。

1. 用液氮将植物或真菌磨成粉末，称取 50-100mg 粉末至 2.0ml 离心管中。
2. **立即加入 0.7ml Buffer PAL/2- 巯基乙醇至样品中，剧烈涡旋打散样品，65°C 放置 10~20 分钟。**

处理易研磨的植物样品(水果果实/鲜嫩叶片等)，转移 100~150mg 样品至研钵中，加入 1ml Buffer PAL/2-巯基乙醇至研钵中，立即进行充分的研磨，然后转移 0.7ml 匀浆液至 2.0ml 离心管中，65°C 放置 20 分钟，按第 3 步进行操作。(可选)Buffer PAL 使用前，加入 2-巯基乙醇至 1%(V/V)。处理复杂的多酚类样品，使用前还可以加入 PVP-40 至 Buffer PAL，终浓度为 2%(W/V)，以提升裂解液的抗氧化能力。大部分样品不需要加入 PVP-40 和巯基乙醇。由于 2-巯基乙醇和 PVP-40 不稳定，添加后的 Buffer PAL 室温放置时间不要超过 1 周。若下游应用对 DNA 污染极为敏感，建议样品用量不要超过 50mg。大量的 DNA 会造成 DNase I 消化不完全。

3. **加入 700µl 氯仿至裂解液中，高速涡旋 15 秒。**室温下，13,000 × g 离心 5 分钟。
4. **转移~500µl 上清液至新的离心管中，加入 1.5 倍体积 Buffer GXP2 至上清中，涡旋 15 秒。**

加入 Buffer GXP2 后有少量的絮状沉淀产生，用移液枪反复吸打几次，尽量打散絮状物。若产生大量的絮状物，可能是因为样品含多糖类物质，重新提取时，样品量要减倍或更多以避免堵塞柱子，提高得率。

- 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积混合液(含沉淀)至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，转移余下的混合液(含沉淀)至柱子。12,000 × g 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 300µl Buffer RW1 至柱子中，12,000 × g 离心 1 分钟。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管。按下表配制 DNase I 反应液混匀。把 DNase I 反应液加到 RNA 柱的膜中央，室温静置 20~30 分钟消化去除 DNA。

成分	用量
DNase I	10 µl
DNase Buffer	70 µl

- 加入 500µl Buffer RW1 至柱子中，室温放置 3 分钟，12,000 × g 离心 30~60 秒。
(可选)处理富含 DNA 的植物样品时，可重复第 8-9 步一次以彻底去除 DNA。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2(己用乙醇稀释)至柱子中，12,000 × g 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500µl Buffer RW2(己用乙醇稀释)至柱子中，12,000 × g 离心 30~60 秒。
- 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。
- 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~100µl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
- 弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

实验步骤 B

该方案采用温和裂解液(PlantZol Reagent,需要另外订购)，适合于从果实类样品中提取 RNA。

1. 植物和真菌：用液氮将植物或真菌样品磨成粉末，称取 50-150mg 粉末至离心管中，立即加入 1ml PlantZol Reagent，涡旋打散样品，室温放置 5 分钟。
处理易研磨的植物样品(水果果实/鲜嫩叶片等)，转移 100~200mg 样品至研钵中，加入 1.5ml PlantZol Reagent，立即进行充分的研磨，然后转移 1ml 匀浆液至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 200 μ l 氯仿至裂解液中，涡旋 15 秒，室温放置 3 分钟。
3. 2~8°C, 13,000 \times g 离心 5 分钟，按方案 A 第 4-13 步进行操作。

常见问题

1. 提取的 RNA 产量低或降解了

- **电泳原因：**常见的 RNA 降解现象都是电泳过程中引起的。更换新的 Loading Buffer 和电泳缓冲液。
- **RNase Free Water 被污染：**RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的 RNase Free Water 或 DEPC 处理水。
- **洗脱不充分：**RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置几分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。

2. DNA 的污染

- 样品用量太多。
- 延长 DNase 消化时间，或增加一次 DNase 消化

3. 纯度低(OD260/OD280<1.65)

- 加入氯仿时没有剧烈振荡，不要用涡旋或颠倒混匀
- 氯仿过量加入
- 裂解不够充分，匀浆后须室温放置 5 分钟
- 减少样品用量