

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案：植物组织 RNA 和 DNA 少量共提取	5
常见问题回答	7

版本: 2018-11

简介

植物和真菌样品含有大量的代谢物质：如多酚类、多糖类以及其它次生代谢物质。这些代谢物质常常会干扰到 RNA 的提取和下游的应用。HiPure Plant RNA/DNA Kit 采用硅胶柱纯化技术和特殊的溶液系统，适合于从各种植物或真菌样品中抽提高纯度的总 RNA 和 DNA。该方法得到的 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。得到的 DNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交等实验。

原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure Plant DNA and RNA Isolation Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在含高浓度异硫氰酸胍裂解液中匀浆裂解，RNA 和 DNA 释放到裂解液中。由于裂解液中含有高浓度异硫氰酸胍，内源性或外源性的核酸酶变性而失活，RNA 和 DNA 被保护起来。裂解液经离心去除不溶解的杂质，转移至 DNA 结合柱吸附 DNA，滤液加入乙醇调节结合条件，转移至 RNA 柱子吸附 RNA。DNA 和 RNA 柱子分别经 Buffer DW1 和 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，RNA 被 RNASE-Free Water (DEPC 处理水)洗脱，DNA 被 Buffer AE 洗脱。

组 成

HiPure Plant DNA and RNA Kit

产品编号	R5115-01	R5115-02	R5115-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer PAL	10 ml	50 ml	180 ml
Buffer GWP	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer RW2*	5 ml	2 x 20 ml	3 x 50 ml
RNase Free Water	1 ml	10 ml	30 ml
Buffer AE	1 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure Plant DNA and RNA Kit 所有组份可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下, Buffer PTL 可能会有沉淀形成, 60℃水浴让沉淀完全溶解后使用。因 DEPC 处理水中不含任何抑菌因子, 室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装 DEPC 处理水并保存于-20℃, 以减少污染。若 DEPC 处理水受到污染, 请重新配制。

DEPC 处理水的配制:

在试剂瓶中装入适量去离子水, 加入 0.1% DEPC, 磁力搅拌器搅拌过夜, 于 120℃灭菌 20-30 分钟。处理后, 分装保存于 2-8℃或-20℃。灭菌后 DEPC 处理水有乙醇气味, 属于正常现象。

需要准备材料和工具

- **14.3M β -巯基乙醇(β -ME)或2M DTT:** 使用前, 分装适量的Buffer PAL, 每Buffer PAL加入40 μ l β -巯基乙醇。Buffer PAL/ β -ME混合液可室温稳定放置1个星期。 β -ME气味难闻, 毒性较强, 可用2 M DTT (Dithiothreitol)代替。用DEPC处理水或灭菌水配制2M DTT, 分装保存于-20 $^{\circ}$ C。按1ml Buffer PAL加入40 μ l 2M DTT的比例配置混合液, 该混合液可于室温放置2天。(市售的 β -巯基乙醇浓度为14.3M)
- 无水乙醇(96-100%)
- 无RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 无RNase 酶的枪头
- 手套
- (<15,000 x g)小型离心机
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2, 并于室温保存。

方案：植物组织总 RNA 和 DNA 小量提取

该方案适合于从 $\leq 100\text{mg}$ 次生代谢物质较少的植物/真菌样品中提取高纯度的总 RNA 和 DNA。以下离心均在室温下进行。

- 植物样品的研磨：**收集植物样品并尽快浸泡到液氮中以防止 RNA 的降解。使用研钵、研磨棒和液氮将植物样品研磨成尽量细小的粉末。RNA 的产量取决于样品类型和研磨效果。(研磨后的植物粉末可直接保持于 -70°C)待液氮挥发后，快速称取 50~100mg 的植物粉末至 1.5ml 预冷的离心管中。对于代谢物质丰富的植物样品，建议先使用 50mg，待取得理想结果后，再酌情提高用量
- 立即加入 600 μl Buffer PAL/2-ME 混合液(预热至 65°C)**，用移液枪吸打混匀直到所有样品都充分分散， 65°C 水浴 15 分钟，其间颠倒混匀一次。

使用前，分装适量的 Buffer PAL，每 1ml Buffer PAL 加入 20 μl β -巯基乙醇。若植物用量增加，Buffer PTL/2-ME 的用量也必须相应地增加。
- 加入 600 μl 氯仿至裂解液中，涡旋混匀 15 秒。**
- 室温下， $14,000 \times g$ 离心 5 分钟。
- 转移 450 μl 上清液至新的离心管中，加入 300 μl Buffer GWP 至上清液中，颠倒混匀 5~10 次。**
- 把 HiPure DNA 结合柱装在 2ml 收集管中。**转移第 5 步获得的裂解液至 DNA 柱子中。**
 $13,000 \times g$ 离心 1 分钟。
- 保留滤液按第 8~15 抽提 RNA，保留柱子按第 16~21 步进行 DNA 抽提。

总 RNA 抽提

- 加入 400 μl 无水乙醇至滤液中**，用移液枪吸打 3~5 次混匀。
- 把 HiPure RNA 柱装在 2ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至 RNA 柱子中。** $13,000 \times g$ 离心 30~60 秒。
- 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**把剩余混合液转移至 RNA 柱子中。** $13,000 \times g$ 离心 30~60 秒。

11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)**，13,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer RW2 使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签或说明书所示进行稀释。
12. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，13,000 \times g 离心 30~60 秒。
13. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 2 分钟，以甩干柱子基质。
14. 把 RNA 柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~50 μ l DEPC 水至柱子的膜中央**。室温静置 1 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
15. 弃去 RNA 柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

DNA 抽提

16. 取第 7 步的 HiPure DNA Mini Column，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**。13,000 \times g 离心 30~60 秒。
17. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**。13,000 \times g 离心 30~60 秒。
18. 倒弃流出液，把柱子套回收集管。13,000 \times g 离心空柱 2 分钟，以甩干柱子基质。
19. 将 DNA 柱子装在 1.5ml 离心管中。**加入 50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央**。室温静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟
20. **再加入 50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央**。室温静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
21. 弃去 DNA 柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 技术人员可随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
柱子堵塞	
样品不充分打散或匀浆	参照样品的打散及匀浆，提高样品的裂解效果； 减少样品的用量或增加裂解液 PAL 的用量；
样品起始用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件
RNA 或 DNA 产量低	
样品不充分匀浆	参照上面
样品起始用量太多	参照上面
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 没有直接加到膜中央
DNA 洗脱效率低	Buffer AE 没有加到膜中央，再加入 30~50 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C 的 Buffer AE 到膜上，室温静置 5 分钟，然后离心洗脱 DNA。
乙醇残留	柱子经 Buffer RW2 洗涤后，把空柱子重新装回收集管，室温，10,000 \times g 离心 2 分钟甩干柱子中的乙醇。
RNA 降解	
组织或细胞用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染。
RNA 产物中 DNA 污染	
样品用量太多	减少组织用量。进行 DNase 膜上处理彻底去除 DNA。

下游实验结果不理想

盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 3 分钟后，再离心。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000 × g，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000 × g 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。