AipEasy 通用植物 RNA 快速大量提取试剂盒(离心柱型)

AipEasy Universal Plant RNA Rapid Maxi Kit(Centrifugal Column)

使 用 说 明 书

◆目录号：RE216

目录编号	包装单位
RE216-01	10次

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	10 次(RE216-01)
裂解液 RLT	室温	100mL
去蛋白液 RW1	室温	60mL
漂洗液 RW	室温	50mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
PlantAip	室温	10mL
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	10 套

◆适用范围：适用于快速大量提取植物组织细胞总 RNA。

◆产品储存：本试剂盒在室温储存 6 个月不影响使用效果。

◆储存事项：

1. 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温(4℃或者－20℃)会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下(15℃－25℃)进行。
3. 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。

◆产品介绍：独特的裂解液/β-巯基乙醇迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，植物 RNA 助提剂 PlantAip 帮助结合多糖多酚并通过离心去除，然后用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗－离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的

RNase-free Water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

◆产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速简捷，单个样品操作一般可在 60 分钟内完成。
4. 独有的植物 RNA 助提剂可以有效结合多糖多酚，提高清除效果。
5. 多次柱漂洗确保高纯度，OD_{260}/OD_{280} 典型的比值达 1.9～2.0，基本无 DNA 残留,可用于 RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

◆注意事项：

1. 所有的离心步骤均可在室温完成，使用可容纳 50mL 离心管的离心机。
2. 需要自备乙醇，一次性注射器(可选)，研钵。
3. 裂解液 RLT 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，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。
4. 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，本公司的 AipEasy 系列 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留(一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见)影响不是很大，如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR,我们建议在进行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。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(cleanup)，请联系我们索取具体操作说明书。
   4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。请联系我们索取具体操作说明书。
5. 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 1.2%，0.5×TBE 电泳缓冲液，150v，15 分钟)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。动物 rRNA 大小分别约为 5kb 和 2kb，分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍，否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重

降解。

纯度：OD_{260}/OD_{280} 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA，OD_{260}/OD_{280} 读数(10mM Tris，pH 7.5)在 1.8-2.1 之间。OD_{260}/OD_{280} 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品，假定在 10mM Tris，pH 7.5 溶液中测出的 OD_{260}/OD_{280} 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 水稀释 n 倍，用 RNase-free 水将分光光度计调零，取稀释液进行 OD_{260} 和 OD_{280} 测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度(ng/μL)=(OD_{260})×(稀释倍数 n)×40

◆操作步骤(实验前请先阅读注意事项)：

提示：第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量无水乙醇！

1. **直接研磨法(推荐)：**

a. 新鲜植物组织称重后取 1-2g 迅速剪成小块放入研钵(冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 1-2g 放入研钵)，加入 10 体积(10mL)RLT 和 1 体积(1mL)PlantAip 室温下充分研磨成匀浆，注意应该迅速研磨让组织和裂解液 RLT 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

注：PlantAip 是提取多糖多酚含量丰富的困难样品不可缺少成分。提取普通植物组织可以不加 PlantAip，RNA 产量可能会提高一些。

b. 将裂解物转入离心管，剧烈摇晃振荡 15 秒，10,000-13,000 xg 离心 10 分钟(如果离心机转速低，可适当延长离心时间)，沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PlantAip，小心取裂解物上清(需计算体积)转到一个新离心管。

c. 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,立即剧烈振荡混匀，不要离心。

d. 立刻接操作步骤项下 3。

2. **液氮研磨法：**

a. 取 10mL 裂解液 RLT，转入 50mL 离心管中，加入 1mL PlantAip 混匀备用。

b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后，取 1-2g 细粉转入上述装有 RLT 和 PlantAip 的离心管，立即用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。

注：在 56℃温育 1-3 分钟有助于裂解植物,但是淀粉含量高的植物不能温育,因为提高的温度可能导致淀粉膨胀。

c. 用带钝针头的一次性 5mL(配 0.9mm 针头)注射器抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA,降低粘稠度和提高产量。

d. 将裂解物 10,000-13,000xg 离心 10 分钟，沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚

的 PlantAip，将所有裂解物上清转到一个新离心管。

e. 较精确估计裂解物(上清)体积，加入 0.5 体积的无水乙醇，此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程，立即剧烈振荡混匀，不要离心。

f. 立刻接操作步骤项下 3。

3. 将混合物加入一个吸附柱 RA 中，(吸附柱放入收集管中)10,000-13,000xg 离心 5 分钟(确保全部通过，膜上无残留液体，否则应加大转速和时间)，弃掉废液。
4. 加 6mL 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，12,000xg 离心 3 分钟，弃掉废液。
5. 加入 10mL 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!)，10,000-13,000xg 离心 1-2 分钟，弃掉废液。加入 10mL 漂洗液 RW，重复一遍。
6. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000xg 离心 5 分钟以干燥膜基质残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，室温或者烘箱晾干几分钟。
7. 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 500μL—1mL RNase-free Water(事先在 70-90℃水浴中加热效果更好)，室温放置 3 分钟，12,000xg 离心 2 分钟。
8. 如果预期 RNA 产量>0.6mg，加 300-500μL RNase-free Water 重复步骤 7，合并两次洗脱液，或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

注: 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%,但是浓度要低，用户根据需要选择。

==========

扫码关注我们