

AipEasy 多糖多酚植物 RNA 快速大量提取试剂盒(离心柱型)

AipEasy Plus Polysaccharide Polyphenols Plant RNA Rapid Maxi Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆目录号：RE217

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	10 次(RE217-01)
裂解液 RLT	室温	100mL
裂解液 RLT Plus	室温	50mL
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
基因组 DNA 清除柱和收集管	室温	10 套
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	10 套

◆适用范围：适用于快速提取植物组织细胞总RNA，使用独有基因组DNA清除柱技术可有效清除gDNA残留，一般不需要使用DNase消化，RNA可直接用于PCR和荧光定量PCR。

◆产品储存：本试剂盒在室温储存，12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：本公司独家推出 AipEasy 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，又独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。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，然后裂解混合物用乙醇调节 RNA 结合吸附到基因组 DNA 清除柱，基因组 DNA 被清除而 RNA 被选择性洗脱滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离子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，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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和裂解液RLT Plus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，需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(Clean up)，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 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(10mM Tris, pH7.5)在1.8-2.1 之间。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10mM 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水稀释n倍, 用RNase-free水将分光光度计调零, 取稀释液进行OD₂₆₀和OD₂₈₀测定, 按照以下公式进行RNA浓度的计算:

终浓度(ng/μL)=(OD₂₆₀)×(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, 10,000-13,000xg 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. 将混合物加入一个基因组清除柱中(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. 将基因组DNA清除柱子放在一个干净50mL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5mL裂解液RLT Plus, 13,000xg 离心2分钟, 收集滤液(RNA在滤液中)加用微量移液器较精确估计滤过液体积(通常为4-5mL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. 将混合物加入一个RNA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。
6. 加6mL去蛋白液RW1, 室温放置1分钟, 12,000xg 离心2分钟, 弃掉废液。
7. 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。
8. 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。
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。
10. 如果预期RNA产量>0.6mg, 加300-500μL RNase-free Water重复步骤9, 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