

HiPure Plant RNA Mini Kit

植物总 RNA 小提试剂盒

本产品适合于从 50~300mg 植物或真菌样品中提取总 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，整个提取过程只需 20~30 分钟。试剂盒采用 DNA 过滤技术，可高效地过滤去除 DNA。本产品包括两套溶液体系，几乎可以解决所有植物或真菌样品的 RNA 抽提。

产品组份

产品编号	R4151-01	R4151-02	R4151-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer PRC1	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer PRC2	5 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

版本号：2018-01

保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 18 个月。低温下，Buffer RL/PRC1 可能会有沉淀形成，55℃水浴让沉淀完全溶解。因 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。推荐分装并保存于 2~8℃，以减少污染。

准备事项

- 在 Buffer RV2 中，加入 4 倍体积的无水乙醇，于室温保存。
- **(可选)提升裂解液的变性能力：**使用前分装适量的 Buffer RL/Buffer PRC1，按每 ml Buffer RL/Buffer PRC1 加入 20 μ l β -巯基乙醇或 2M DTT，混合液室温可保存 1 周。由于 β -巯基乙醇/DTT 的毒性，多数情况下，不添加也可得到完整的 RNA。
- 多酚类样品(葡萄/芒果/茶叶等)：在 Buffer RL 或 Buffer PRC1 中，加入 PVP-40 至终浓度为 2% (V/V)，完全溶解后再进行提取，可以解决大部分多酚类样品提取失败的问题。由于 PVP-40 会干扰 gDNA Filter Column 过滤效果，加入 PVP-40 至 Buffer RL/PRC1 后，DNA 污染会加重，建议 DNA 酶上消化法进一步去除 DNA。

实验步骤

A. 简的植物/真菌样品(经济作物类、丝状真菌)

该方案能快速从次生代谢物质较少的植物/真菌样品中提取的总 RNA，如水稻、玉米、黄豆、番茄、棉花、烟草等。若该方案提取失败，建议尝试 B 方案。

1. **液氮研磨：**用液氮将植物或真菌样品研磨成细小粉末。称取 50~300mg 粉末至 1.5~2.0ml 预冷的离心管中。
加裂解液前样品不能解冻。初次使用推荐样品量为 50~100mg，根据结果再调整用量。易提取样品，样品量可达到 300mg。
2. **立即加入 800 μ l Buffer RL 至样品中，**高速涡旋 15~30 秒打散样品，室温静置 3 分钟。
3. 室温，14,000 \times g 离心 5 分钟。
4. **把 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。转移上清液转移至过滤柱中。**14,000 \times g 离心 2 分钟，弃去 gDNA 过滤柱。
5. **加入 0.5 倍体积无水乙醇(350 μ l)至滤液中，**用移液枪吸打 3~5 次，按第 6 步进行操作。

B. 复杂的植物/真菌样品(木本植物、大型真菌)

该方案适合从各种植物和真菌样品抽提 RNA。成功提取的样品：富含多酚类植物样品如葡萄叶片、白松叶片、红背桂叶片、棉花、荔枝叶片等。富含多糖类的植物样品，如蕃薯叶片，花生叶片、香蕉叶片等。

1. **液氮研磨：**用液氮将植物或真菌样品研磨成细小的粉末。称取 50~150mg 粉末至 1.5ml 预冷的离心管中。
加裂解液前样品不能解冻。初次使用推荐样品量为 30~50mg，根据结果再调整用量。

2. **立即加入 750 μ l Buffer PRC1/ β -ME 至样品中**, 高速涡旋 15~30 秒打散样品。55 $^{\circ}$ C 短暂水浴 3~5 分钟。
处理某些多酚类样品, 如桉树叶片, 称取适量的 PVP-40 粉末至 Buffer PRC1 中, 浓度 2~5% (w/v)。充分溶解后再进行操作有利于提高产量。处理富含淀粉类的样品, 加入裂解液后室温静置 3~5 分钟代替 55 $^{\circ}$ C 水浴, 以防止淀粉糊化。
3. 室温, 14,000 \times g 离心 5 分钟。
4. **把 gDNA 过滤柱装在 2ml 收集管中。转移 700 μ l 上清液转移至过滤柱中**。13,000 \times g 离心 2 分钟。弃去 gDNA 过滤柱。
5. **加入 0.5 倍体积无水乙醇或等倍体积的 Buffer PRC2 至滤液中**, 移液枪吸打 3~5 次, 按第 6 步进行操作。
多数样品加入无水乙醇时, 产量更高。处理复杂多糖类样品, 加入 Buffer PRC2 可提高纯度。

过柱纯化 RNA

6. **把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 \leq 700 μ l 混合液至柱子中**。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. **(若混合液超过 700 μ l) 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子**。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
8. **倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RW1 至柱子上**。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
gDNA 过滤柱可去除 95-99% 的基因组 DNA 污染。多数应用无需进一步处理。由于 PCR 敏感高, 对单拷贝数基因也都有可能被扩增, 若纯化的 RNA 用于 RT-PCR, 建议订购我司的 DNase on Column Kit(R4911)进行膜上 DNase 消化, 以彻底去除 DNA。
9. **倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer RW2 至柱子中**, 12,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer RW2 在使用之前, 须按瓶子标签指示加入无水乙醇进行稀释。
10. **倒弃滤液, 把柱子装回收集管。加入 500 μ l Buffer RW2 至柱子中**, 12,000 \times g 离心 30~60 秒。
11. **倒弃滤液, 把柱子装回收集管**。12,000 \times g 离心 2 分钟。
12. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。**加入 30~100 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央**。室温静置 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
柱子最小的洗脱体积是 30 μ l, 若 RNA 产量超过 30 μ g, 推荐进行第二次洗脱。
13. 弃去柱子, 把 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量，超量样品反而会降低产量和纯度。由于植物样品的复杂性，降低样品量至 20~30mg。
- **富含多糖类样品：**采用 B 方案进行抽提，或降低样品量至 20~30mg。
- **裂解液离心不充分：**加大裂解液的用量，延长裂解液的离心时间以去除高分子量杂质。
- **室温静置代替 55°C 温浴：**处理淀粉丰富样品，如种子，加入 Buffer PRC1 混匀后，室温放置 3~5 分钟代替 55°C 水浴。高温会引起淀粉糊化。

2. RNA 产量低

- **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。
- **多酚氧化：**处理多酚类物质，加入 PVP-40 至 Buffer PRC1 至终浓度为 2%(W/V)，溶解后再抽提。
- **B 方案更通用：**实验表明，若使用 A 方案提取失败，B 方案都可以提取成功。

3. RNA 降解

- **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。
- **样品贮藏问题：**反复解冻会引起 RNA 降解，确保样品解冻次数不要超过 2 次。
- **裂解问题：**液氮研磨后不要让样品解冻，快速加入裂解液并立即打散样品。样品只能充分裂解打散后，内源的核酸酶才能被灭活，RNA 才不会降解。
- **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。

4. DNA 的污染

- **DNase I 消化：**gDNA 过滤柱可去除 95~99% 的 DNA 污染。DNA 去除效果取样品类型和用量。若纯化的 RNA 用于 RT-PCR，建议订购我司的 DNase on Column Kit 进行膜上 DNase 消化以彻底去除 DNA。