

AipEasy 通用植物 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)

AipEasy Universal Plant RNA Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆目录号：RE213

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(RE213-01)
裂解液 RLT	室温	50mL
去蛋白液 RW1	室温	40mL
漂洗液 RW	室温	10mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
PlantAip	室温	5mL
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	50 套

◆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. 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。
2. 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. 完全不使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 方便简捷，单个样品操作一般可在 25 分钟内完成，世界上最简单快速的试剂盒。
3. 独有的植物 RNA 助提剂 PlantAip 可以有效结合多糖多酚，提高清除效果。
4. 世界先进适应性极其广泛，可以提取包括棉花、月季、拟南芥、杨树等数百种国内

外试剂盒提取失败的样品。

5. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值高达 2.1~2.2，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR 和 Northern-blot 等各种实验。

◆**注意事项：**

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机。
2. 需要自备乙醇，研钵(可选)。
3. 裂解液 RLT 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，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已经清除了绝大部分的 DNA 残留，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留影响不是很大，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 柱上消化处理。购买 DNA 酶柱上消化试剂盒(货号：RE280)前可先索取具体操作说明书。
5. 关于复杂植物样品提取残留较多 DNA 的情况有两个选项：
 - 1) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 柱上消化处理。购买 DNA 酶柱上消化试剂盒(货号：RE280)前可先索取具体操作说明书。
 - 2) 部分较复杂的植物样品提取时，可能残留较多 DNA，可以尝试本公司的 AipEasy Plus 多糖/多酚植物 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)(货号：RE214)。RE214 在本试剂盒的基础上，又独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 DNA 残留，在大多数情况下，可以将 DNA 残留清除到紫外下观测不可见。
6. 关于特别复杂难提取植物样品提取失败或者产量低的情况：
 - 1) 一些特别复杂的植物样品提取，如水稻种子，葡萄果实，蓝靛果果实，百合鳞茎，土豆块茎等，RE213 裂解液 RLT 无法提取，需选择 AipEasy 多糖/多酚/复杂植物 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)(货号：RE215)。
 - 2) 一些样品产量较低，也可以尝试 AipEasy 多糖/多酚/复杂植物 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)(货号：RE215)。RE215 配有强力裂解液 CLB 选项，在很多情况

下，可以提取复杂样品或者明显提高产量(详情请看 RE215 说明书)。

◆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 100mg-200mg 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 100mg-200mg 放入研钵), 加入 10 体积(1mL)RLT 和 1 体积(100 μ L)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 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富的困难样品不可缺少成分。

b. 将裂解物转入离心管, 剧烈摇晃振荡 15 秒, 13,000rpm 离心 5-10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PlantAip。

c. 取 480 μ L 裂解物上清(在不超过 RNA 吸附柱能力的情况下可以取更多或者全部上清, 这样可以提高产量)转到一个新离心管。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, 立即吹打混匀, 不要离心。

d. 立刻接操作步骤的步骤 3。

2. 液氮研磨法(提取复杂, 易降解样品时推荐此法):

a. 取 500 μ L 裂解液 RLT, 转入 1.5mL 离心管中, 加入 50 μ L PlantAip 混匀备用。

b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后, 取 50mg-100mg 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。

c. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡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 13,000 rpm 离心 5-10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PlantAip。

e. 取裂解物上清(在不超过 RNA 吸附柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量)转到一个新离心管。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, 立即吹打混匀, 不要离心。

f. 立刻接操作步骤的步骤 3。

注 以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理, 可以提高产量。也就是使用 1mL 的裂解液 RLT 和 100 μ L PlantAip 和 100mg-200mg 的样品。

3. 将混合物(每次小于 720 μ L, 多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中)13,000 rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。

注: 确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。

4. 加 700 μ L 去蛋白液 RW1, 室温放置 1 分钟, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
5. 加入 500 μ L 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 13,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。加入 500 μ L 漂洗液 RW, 重复一遍。
6. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
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 30-50 μ L RNase-free Water(事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量), 室温放置 1 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。
8. 如果预期 RNA 产量 > 30 μ g, 加 30-50 μ L RNase-free Water 重复步骤 7, 合并两次洗液, 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 RNA 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。

◆附录: DNA 酶柱上消化(详细请参考 RE280 DNase I 柱上消化试剂盒说明书)

1. 按照前面所列 RE213 试剂盒操作步骤操作, 直到做完操作步骤 3。
2. 取 45 μ L DNase I buffer 和 5 μ L RNase-free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液(处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液)。
3. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ L 去蛋白液 RW1, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
4. 向吸附柱 RA 中央加入 50 μ L 的 DNase I 工作液, 室温(20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C)放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上向膜四周浸润充分和膜接触, 不要让工作液滴在 O 型垫圈或是离心柱管壁上挂壁或者挂在垫圈上不能充分和膜接触。
5. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ L 去蛋白液 RW1, 12,000rpm 离心 30-60 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
6. 接操作步骤 5 完成后续步骤。

=====

