

For research use only

Version Number: 1.1

## Plant Total RNA Isolation Kit Plus

For total RNA purification from general plant samples containing high polysaccharide and polyphenol components

试剂盒组成	RE-05021	RE-05024
	50 T	200 T
Buffer PSL1*	25 mL	100 mL
Buffer PS	5 mL	20 mL
Buffer PSL2	24 mL	96 mL
Buffer PRW1*	25 mL	100 mL
Buffer PRW2	24 mL	96 mL
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	10 mL	40 mL
RNA-Only Column	50 套	200 套
DNA-Cleaning Column	50 套	200 套
说明书	1 份	1 份

\*: Buffer PSL1、Buffer PRW1 中含有具刺激性的离液盐，操作时注意戴上手套和进行相关防护措施。

### 产品简介

该试剂盒采用本公司研制的离心柱和配方，可以从各种多糖多酚含量高的植物组织中高效率的提取得到高纯度高质量的总 RNA。试剂盒提供的高效 DNA-Cleaning Column 能轻松的让上清液和组织裂解物分离并吸附除去基因组 DNA，操作简便、省时。

全体系 RNase-Free，使得提取的 RNA 无降解；Buffer PRW1、Buffer PRW2 缓冲液洗涤体系，使得获得的 RNA 纯度极高。

### 储存条件

- ❖ 本试剂盒在常温(15-25°C)干燥条件下，可保存 24 个月；如需保存更长时间可置于 2-8°C。
- ❖ Buffer PSL1 在加入β-巯基乙醇(可选择不加)后可在 4°C 放置 1 个月(建议现做现添加)。

注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。

### 注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行(包括离心)，切勿使用冰浴和低温(4°C)离心。
- ❖ 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 RNA 降解且提取量也会下降。
- ❖ 新鲜植物叶片的用量不要超过 50 mg，否则会影响 RNA 产量和纯度。
- ❖ 试剂盒使用前，请在 Buffer PSL1 中加入β-巯基乙醇。每 500 μL Buffer PSL1 加入 10 μL β-巯基乙醇，**建议现配现用**，Buffer PSL1 在加入β-巯基乙醇后可在 4°C 放置 1 个月。
- ❖ 试剂盒使用前，请在 Buffer PSL2 中添加无水乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。
- ❖ 试剂盒使用前，请在 Buffer PRW2 中添加无水乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。
- ❖ RNA 产率和质量与细胞样本用量和洗脱体积有关，建议每 500 μL Buffer PSL1 使用组织量 50 mg。
- ❖ 洗脱体积：洗脱液体积不应少于 50 μL，否则会影响 RNA 回收效率。
- ❖ 请检查试剂盒中的 Buffer PSL1 和 Buffer PRW1 是否有晶体析出现象，若低温存放后有晶体析出，可将 Buffer 放置于室温或 37°C 一段时间，将晶体溶解后混匀再使用。

### 材料取用说明

多糖多酚含量高的植物组织：单次处理，用量请勿超过 50 mg。

### 操作步骤(全程常温(15-25°C)操作，切勿冰浴和低温离心)

使用前请先在 Buffer PSL2 和 Buffer PRW2 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取 500 μL Buffer PSL1 于 2 mL 离心管中，加入 10 μL β-巯基乙醇(需自备)，混匀待用。
2. 取适量新鲜植物叶片或组织，尽量剪碎，置于预冷的研钵中，加入液氮充分研磨。
3. 迅速称取 50 mg 研磨好的新鲜植物叶片或组织粉末，转移至 Buffer PSL1 中，剧烈震荡混匀，室温静置 5 min。

注意：组织量不要超过 50 mg，否则会导致 RNA 的质量下降。在植物叶片粉末融化之前迅速转移，细胞破碎后，在无冷冻环境中，RNA 极容易发生降解。

- 向上述液体中加入 **100  $\mu$ L Buffer PS**，轻柔混匀。
- (可选步骤)如果发现组织裂解后的溶液中有比较明显的组织碎片或溶液过于粘稠，12,000 rpm (~13,400  $\times$ g) 常温离心 2-5 min，取上清进行下一步操作；如果溶液无可见碎片、澄清，请忽略此步骤。
- 将所有上清液转移至 DNA-Cleaning Column 中(DNA-Cleaning Column 放入收集管中)，13,300 rpm (~17,000  $\times$ g)离心 2 min。移除 DNA-Cleaning Column，保留收集管内上清液。

注意：植物组织裂解液比较粘稠，在转移液体时可以将枪头尖端剪掉，便于取样。虽然大部分的细胞碎片被截留在 DNA-Cleaning Column 膜上，但是还是会有一些微量的细胞碎片会通过 DNA-Cleaning Column，在收集管底部以沉淀形式存在。小心地将上清液转移至干净离心管中再进行步骤 7，切勿将沉淀吸入上清液中。

- 小心转移经过 DNA-Cleaning Column 离心过滤的上清液到 2 mL 新的 RNase-Free 离心管(需自备)中，向其中(体积应约为 600  $\mu$ L 上清液)中加入 **1.5 倍(约 900  $\mu$ L)体积 Buffer PSL2**(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇)，轻柔混匀以备下面 RNA 纯化步骤使用。**如果出现沉淀，切勿进行离心操作。**

注意：Buffer PSL2 加入量请按照实际操作过程中上清液的体积进行比例换算加入。例如：600  $\mu$ L 上清液中加入 900  $\mu$ L Buffer PSL2(已加入无水乙醇)。混合液可能出现浑浊或絮状沉淀，请直接进行步骤 8 即可。

- 将 **750  $\mu$ L** 上述混合液小心转移至 RNA-Only Column 中(RNA-Only Column 放入收集管中)，轻轻盖上离心柱盖子，12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心 1 min，弃掉收集管中的废液。
- 如果混合液中出现絮状沉淀，请将沉淀一并转移至 RNA-Only Column 中。
- 将 RNA-Only Column 放回收集管中，将剩余混合液全部加入 RNA-Only Column 中，12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)，离心 1 min，弃掉收集管中的废液。
- 向 RNA-Only Column 中加入 **500  $\mu$ L Buffer PRW1**，轻轻盖上离心柱盖子，12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心 1 min，弃掉收集管中的废液。

注意：离心完成后，小心的移走 RNA-Only Column，不要让离心柱底部碰触收集管内的废液。

步骤 10、11、12 均需注意此细节。

- 向 RNA-Only Column 中加入 **700  $\mu$ L 无水乙醇**，12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心 1 min，弃掉收集管中的废液。
- 向 RNA-Only Column 中加入 **700  $\mu$ L Buffer PRW2**(使用前请确认已按照说明加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心 1 min，弃掉收集管中的废液。
- 重复步骤 12。
- 将 RNA-Only Column 放回收集管中，12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)空管离心 2 min,弃掉收集管。
- 将 RNA-Only Column 转移至新的离心管中，向 RNA-Only Column 的膜中央滴加 **50-200  $\mu$ L** 已于 **65°C**预热的 **RNase-Free ddH<sub>2</sub>O**(切勿将洗脱液添加到压圈上，否则会损失较大体积的洗脱液)，室温放置 2 min。12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心 1 min 收集 RNA 溶液。

注意：RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 加入体积不应低于 50  $\mu$ L，体积过小会影响洗脱效率。为提高 RNA 产量，可将离心得到的 RNA 溶液重新加至 RNA-Only Column 中，重复步骤 14。

得到的 RNA 溶液可直接用于下游实验或置于 -80°C 保存。由于本试剂盒对 RNA 二级结构保护较好，建议凝胶电泳之前，先将得到的 RNA 溶液置于 72°C 变性处理 5-10 min。

