

## RaPure Plant RNA Kit

植物 RNA 快提试剂盒(单柱型)

### 产品简介

本产品适合于从快速从植物样品中提取高纯度总RNA。试剂盒结合了两种高效的RNA抽提技术，将一步法的RNA抽提技术和硅胶柱RNA纯化技术结合起来，可最大程度上提高RNA的纯度。得到的RNA可直接用于RT-PCR、Northern Blot、poly A<sup>+</sup>纯化、核酸保护和体外翻译等实验。

### 产品组份

产品编号	R4014-01	R4014-02	R4014-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
PlantZol Reagent	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer BCP	1.5 ml	6 ml	30 ml
Buffer GDP	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer RV1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RV2*	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：202401

## 保存条件

本产品除 PlantZol Reagen 外，其它组份可在室温保存 18 个月。PlantZol Reagent 采用室温运输，收到产品后，把 PlantZol Reagent 保存于 2~8℃。

## 准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。

## 实验步骤

### 1. 根据实验条件或样品类型，选择研磨方法：

- **直接研磨法（易研磨样品）：**称取新鲜或冰冻样品 50~150mg，并迅速处理成小碎片放入研钵中，加入~1.2ml PlantZol Reagent，研磨成匀浆液。转移 1ml 匀浆液至 1.5ml 离心管中。

- **液氮研磨法：**用液氮将植物或真菌样品磨成粉末，称取 50-150mg 粉末至离心管中，立即加入 1ml PlantZol Reagent，涡旋打散样品，室温放置 5 分钟。也可以直接加入~1.2ml PlantZol Reagent 至研钵中，进一步将粉末研磨成匀浆液，然后转移 1ml 匀浆液至 1.5ml 离心管中。

### 2. 可选：60℃ 温育 10 分钟可以提升裂解效果从而提高 RNA 产量。

### 3. 加入 100µl Buffer BCP 至裂解液中，涡旋混匀 15 秒。

### 4. 4℃，13,000 x g 离心 5 分钟。

若无低温离心，也可以在室温下离心。

### 5. 转移~500µl 上清液至新的离心管中，加入 500µl Buffer GDP，颠倒混匀 6-8 次。

### 6. 加入 500µl 无水乙醇至样品中，涡旋混匀 5~10 秒。

### 7. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移≤750µl 混合液至柱子中。12,000 x g 离心 30~60 秒。

### 8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。12,000 x g 离心 30~60

秒。

9. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer RW1 至柱子上。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。**

若需彻底去除 DNA，建议订购 (R4911) DNase on Column Kit 进行膜上 DNase 消化。

10. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)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。

11. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。**

12. **倒弃滤液，把柱子装回收集管。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。**

13. **将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30~80 $\mu$ 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。弃去柱子，把 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C。**

HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 30 $\mu$ l，若 RNA 产量超过 30 $\mu$ g，推荐进行第二次洗脱。本产品只回收 >200nt RNA，低于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA 和 rRNA 等，在纯化过程中被去掉。

当 RNA 总量高于 10 $\mu$ g 时，OD<sub>260/230</sub> 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 $\mu$ g 时，A<sub>260/230</sub> 会在 0.7~2.0；当 RNA 总量低于 3 $\mu$ g，A<sub>260/230</sub> 会低于 0.6。这是因为 Buffer RTL、RW1 含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值，因此 A<sub>260/230</sub> 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研究表明，低浓度异硫氰酸胍不影响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下，适量提高样品用量和裂解液用量，提高核酸浓度（核酸总量 >10 $\mu$ g）时，OD<sub>260/230</sub> 可以明显改善。

## 常见问题

### 1. 提取的 RNA 产量低或降解了

- **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。
- **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。
- **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。

### 2. DNA 的污染

- **上清液转移得太多：**建议只转移上清 400~450 $\mu$ l，中间层富含 DNA。
- 样品用量太多。

### 3. 纯度低(OD260/OD280<1.65)

- 加入氯仿时没有剧烈振荡，不要用涡旋或颠倒混匀
- 氯仿过量加入
- 裂解不够充分，匀浆后须室温放置 5 分钟
- 减少样品用量；