

## 产品组分

| 组分名称                                                                   | 组分编号    | 规格     | 保存条件 |
|------------------------------------------------------------------------|---------|--------|------|
|                                                                        |         | 50 RXN |      |
| 裂解液 RL1 (Buffer RL1)                                                   | RM30140 | 25 mL  | RT   |
| 裂解液 RL2 (Buffer RL2)                                                   | RM30145 | 50 mL  | RT   |
| 去蛋白液 PR2 (Buffer PR2)                                                  | RM30141 | 35 mL  | RT   |
| 漂洗液 WB2 (Buffer WB2)*                                                  | RM30144 | 12 mL  | RT   |
| 还原剂 AB (Buffer AB)                                                     | RM30146 | 5 mL   | RT   |
| RNase-free H <sub>2</sub> O                                            | RM30142 | 5 mL   | RT   |
| RNase-free 吸附柱和收集管 (RNase-free Adsorption Column and Collection Tubes) | RM30185 | 50 pk  | RT   |
| gDNA 清除柱和收集管 (gDNA Remove Column and Collection Tubes)                 | RM30186 | 50 pk  | RT   |
| 1.5 mL RNase-free Centrifuge Tubes                                     | RM30202 | 50 pk  | RT   |

\*注: 50 RXN漂洗液Buffer WB2首次使用前加入48 mL无水乙醇。

## 产品说明

本试剂盒用于普通植物及复杂植物(多糖多酚植物) RNA 提取, 试剂盒不依赖于苯酚、氯仿等有毒试剂, 利用硅胶柱纯化技术可清除 gDNA 残留, 快速提取植物总 RNA。提取的 RNA 可直接用于 RT-PCR、qPCR 及 RNA 建库等实验。

## 保存温度

本试剂盒室温储存 18 个月不影响使用效果。不适合保存在低温条件下, 容易产生沉淀进而影响实验效果, 保存和运输均可在室温进行。

## 注意事项

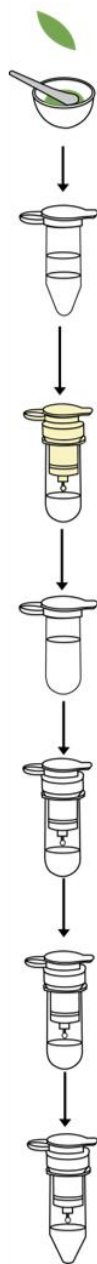
1. 本产品仅限于专业人员进行科学研究使用, 不得用于临床诊断或治疗。
2. 所有离心步骤均在室温进行, 使用转速 $\geq 13,000$  rpm (~ 14,000 x g) 的离心机。
3. Buffer RL1、Buffer RL2、Buffer PR2 中含有刺激性化合物, 操作时戴乳胶手套, 避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 要用大量清水或者生理盐水冲洗。
4. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶, 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
5. 本试剂盒可去除体系中绝大多数的 DNA 污染, 纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase I 处理即可用于下游实验操作。如果下游实验对痕量 DNA 十分敏感, 可以使用 DNase I 进一步清除 DNA 污染。
6. 使用本试剂盒时, 请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩、使用 RNase-free 耗材, 避免 RNase 污染。

## 实验前准备

1. 自备材料: 无水乙醇、 $\beta$ -巯基乙醇、RNase-free 离心管。
2. 第一次使用前请先在 50 RXN 漂洗液 WB2 瓶加入 48 mL 的无水乙醇!
3. 使用前需检查 Buffer RL1、Buffer RL2 是否有沉淀, 如果有沉淀, 需要在 65°C 水浴来溶解, 待溶液澄清后方可使用。
4. 若提取普通植物 RNA, 需在实验前取 500  $\mu$ L Buffer RL1 至离心管中, 加入 50  $\mu$ L Buffer AB, 混匀备用。多个样品按照比例放大准备。
5. 若提取复杂植物 RNA, 需在实验前取 1 mL Buffer RL2 至离心管中, 加入 5%  $\beta$ -巯基乙醇 (1 mL Buffer RL2 加 50  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇)。混匀后 65°C 水浴中预热。多个样品按照比例放大准备。

## 实验流程示意图

## 普通植物RNA提取流程示意图



液氮研磨:将植物样本放入液氮中, 研磨成粉末, 称取适量 (50-100 mg) 进行实验。

裂解: 加入500  $\mu$ L的Buffer RL1 (已加入50  $\mu$ L Buffer AB), 涡旋振荡30-60 sec;  
13,000 rpm (14,000 x g) 离心5-10 min, 保留上清液。

柱法去除gDNA: 将上清液转至放好收集管的gDNA清除柱上, 13,000 rpm (14,000 x g)  
离心2 min, **收集滤液 (gDNA在柱上, RNA在滤液中)**。

调节过柱环境: 向滤液中加入0.5倍体积的无水乙醇, 吹打混匀。

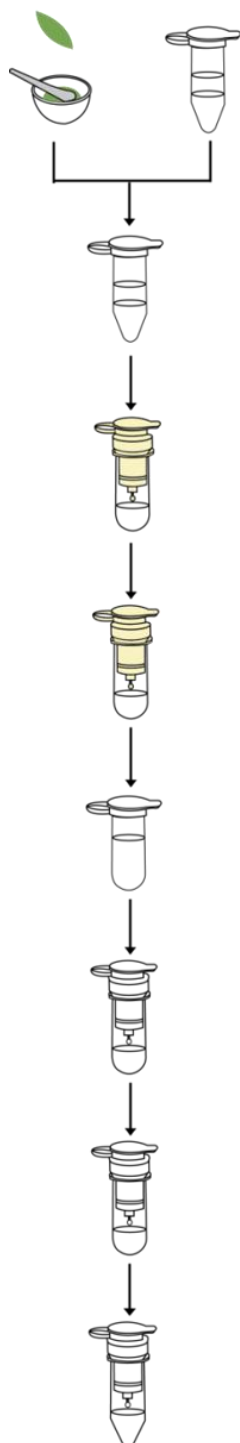
RNA吸附: 将混合物全部转移到放好收集管的RNase-free吸附柱中;  
13,000 rpm (14,000xg) 离心2 min, **倒去滤液 (RNA在吸附柱上)**。

## 洗涤RNA:

1. 去除蛋白: 向吸附柱中加入700  $\mu$ L 去蛋白液 PR2, 13,000 rpm (14,000 x g) 离心30 sec, **倒去滤液 (RNA在吸附柱上)**;
2. 去除盐离子: 向吸附柱中加入500  $\mu$ L 漂洗液WB2 (首次使用在WB2瓶中加入48 mL无水乙醇), 13,000 rpm (14,000 x g) 离心30 sec, **倒去滤液 (RNA在吸附柱上)**;
3. 重复2一次;
4. 去除漂洗液: 空管13,000 rpm (14,000 x g) 离心2 min, **倒去滤液 (RNA在吸附柱上)**。

洗脱RNA: 向吸附柱正中心加入30-50  $\mu$ L的RNase-free H<sub>2</sub>O, 室温静置1 min, 13,000 rpm (14,000 x g) 离心1 min **(RNA在滤液中)**。

## 复杂植物RNA提取流程示意图



**液氮研磨：**将植物样本放入液氮中研磨成粉末，称取适量（100-200 mg）进行实验。

**裂解：**加入1 mL已经65°C预热的Buffer RL2（已加入50  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇）；  
涡旋振荡 30-60 sec，65°C水浴5-10 min，偶尔来回颠倒1-2次；  
将裂解物 13,000 rpm（14,000xg）离心10 min，保留上清液。

**吸附gDNA和RNA：**转移上清液，加入0.5倍体积的无水乙醇，吹打混匀；  
将混合液加入到放好收集管的gDNA清除柱中，静置1 min；  
13,000 rpm（14,000 x g）离心2 min，**倒去滤液（gDNA和RNA在吸附柱上）。**

**洗脱RNA：**将gDNA清除柱放在一个新的RNase-free离心管中，加入500  $\mu$ L裂解液RL1；  
13,000 rpm（14,000 x g）离心30 sec，**收集滤液（gDNA在柱上，RNA在滤液中）。**

**调节过柱环境：**向滤液中加入0.5倍体积的无水乙醇，吹打混匀。

**RNA吸附：**将滤液全部转移到放好收集管的RNase-free吸附柱中，静置1 min；  
13,000 rpm（14,000 x g）离心30 sec，**倒去滤液（RNA在吸附柱上）。**

**洗涤RNA：**

1. 去除蛋白：向吸附柱中加入700  $\mu$ L 去蛋白液 PR2，静置1 min，13,000 rpm（14,000 x g）离心30 sec，**倒去滤液(RNA在吸附柱上)；**
2. 去除盐离子：向吸附柱中加入500  $\mu$ L的漂洗液WB2（首次使用在WB2瓶中加入48 mL无水乙醇），13,000 rpm（14,000 x g）离心30 sec，**倒去滤液（RNA在吸附柱上）**
3. 重复2一次
4. 去除漂洗液：空管13,000 rpm（14,000 x g）离心2 min，**倒去滤液（RNA在吸附柱上）。**

**洗脱RNA：**向吸附柱正中心加入30-50  $\mu$ L的RNase-free H<sub>2</sub>O，室温静置1 min，13,000 rpm（14,000 x g）离心1 min **（RNA在滤液中）。**

## 实验步骤（请先阅读注意事项）

### 普通植物 RNA 提取（该流程也适用于一般的多糖多酚类植物样本，如杨树、月季、棉花、番茄等）

1. 样本处理（推荐液氮研磨）：植物样本在液氮中迅速研磨成粉末，液氮研磨后的样本如不立即进行下一步操作，请置于-80℃保存。
2. 取 500 μL Buffer RL1 至 RNase-free 离心管（自备）中，加入 50 μL Buffer AB，混匀备用。  
**注：Buffer AB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的成分。**
3. 称取 50-100 mg 液氮研磨后的样本，加入至上述 Buffer RL1（已加有 Buffer AB）离心管，涡旋振荡 30-60 sec，使其充分裂解，将裂解物 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 5-10 min。
4. 将上清液转移至放好收集管的 gDNA 清除柱中（若上清液较多，可分次加入到 gDNA 清除柱中），13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 2 min，**收集滤液**。
5. 向滤液中加入 0.5 倍体积的无水乙醇，立即用移液器吹打混匀。
6. 将混合物加入至放好收集管的 RNase-free 吸附柱中，13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 2 min，**倒去滤液**。
7. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中，向吸附柱中加入 700 μL 去蛋白液 PR2，13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 30 sec，**倒去滤液**。
8. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中，向吸附柱中加入 500 μL 漂洗液 WB2（**确认首次使用前已加入 48 mL 无水乙醇**），13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 30 sec，**倒去滤液**。
9. 重复上述步骤 8 一次。
10. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中，空管 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 2 min，去除残留在吸附柱中的漂洗液 WB2。
11. 取出 RNase-free 吸附柱，放至新的 RNase-free 离心管中，向**吸附柱的中间部位**悬空加入 30-50 μL 的 RNase-free H<sub>2</sub>O（70-90℃预热后效果更佳），室温静置 1 min 后，13,000 rpm (14,000 x g) 离心 1 min，将 RNA 洗脱下来。  
**注：洗脱体积建议不少于 30 μL，体积小会影响核酸回收效率。为提高洗脱效率，可将第一次洗脱液重新加入吸附柱进行二次洗脱。**
12. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或-80℃保存。

### 复杂植物 RNA 提取（该流程适用于特别难提取的多糖多酚类植物）

1. 样本处理（推荐液氮研磨）：植物样本在液氮中迅速研磨成粉末，液氮研磨后的样本如不立即进行下一步操作，请置于-80℃保存。
2. 取 1 mL Buffer RL2 至 RNase-free 离心管（自备）（若 Buffer RL2 有析出或沉淀需先置于 65℃ 水浴重新溶解），加入 50 μL β-巯基乙醇，颠倒混匀后 65℃ 水浴中预热，多个样品按照比例放大准备。  
**注：β-巯基乙醇是裂解液RL2的关键成分，必要时可以提高终浓度至10-20%。如果样本是特别复杂植物，可以尝试在裂解液RL2中加入PVP-40至终浓度2%。**
3. 称取 100-200 mg 细粉（针对含水量低的样本，可加入 100 mg-150 mg；针对含水量高的样本水，可适量增加样本投入量）转移至预热的 Buffer RL2（已加有β-巯基乙醇）离心管中。涡旋振荡 30-60 sec，使其充分裂解，降低粘稠度和提高产量。
4. 短暂放回 65℃ 水浴中（5-10 min），中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。将裂解物 13,000 rpm (14,000 x g) 离心 10 min，沉淀不能裂解的碎片。
5. 将上清液收集至 RNase-free 离心管中，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，此时可能出现沉淀，但是不影响后续提取，立即吹打混匀，不要离心。  
**注：如上清表面有漂浮物，用吸头挑开吸取下面液体即可。**
6. 将混合物转移至放好收集管的 gDNA 清除柱中（每次小于 750 μL，可分多次加入），静置 1 min，13,000 rpm (14,000 x g) 离心 2 min，**倒去滤液**。  
**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。**
7. 将 gDNA 清除柱放在一个干净 RNase-free 离心管内，加入 500 μL Buffer RL1，13,000 rpm (14,000 x g) 离心 30 sec，**收集滤液（RNA 在滤液中）**。
8. 向滤液中加入 0.5 倍体积的无水乙醇（约 250 μL），吹打混匀。  
**注：若加乙醇后出现浑浊或有絮状物产生，属正常现象，立即吹打混匀，不要离心。**
9. 将混合物加入至放好收集管的 RNase-free 吸附柱中，静置 1 min，13,000 rpm (14,000 x g) 离心 30 sec，**倒去滤液**。  
**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。**
10. 将 RNase-free 的吸附柱放回收集管中，向吸附柱中加入 700 μL 去蛋白液 PR2，室温放置 1 min，13,000 rpm (14,000 x g) 离心 30 sec，**倒去滤液**。
11. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中，向吸附柱中加入 500 μL 漂洗液 WB2（**确认首次使用前已加入 48 mL 无水乙醇**），13,000 rpm

(14,000 x g) 离心 30 sec, **倒去滤液**。

12. 重复上述步骤 11 一次。

13. 将 RNase-free 吸附柱放回收集管中, 空管 13,000 rpm (~14,000 x g) 离心 2 min, 去除残留在吸附柱中的漂洗液 WB2。

14. 取出 RNase-free 吸附柱, 放至新的 RNase-free 离心管中, 向**吸附柱的中间部位**悬空加入 30-50  $\mu$ L 的 RNase-free  $H_2O$  (70-90°C 预热后效果更佳), 室温静置 1 min 后, 13,000 rpm (14,000 x g) 离心 1 min, 将 RNA 洗脱下来。

**注:** 洗脱体积建议不少于30  $\mu$ L, 体积过小会影响核酸回收效率。为提高洗脱效率, 可将第一次洗脱液重新加入吸附柱进行二次洗脱。

15. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或 -80°C 保存。