

HiPure Plant RNA Midi Kit

植物总 RNA 中提试剂盒

产品简介

本产品适合于从300~1000mg植物或真菌样品中提取总RNA。试剂盒基于硅胶中量柱纯化技术，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40~50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	R4152-01	R4152-02	R4152-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Midi Columns	2	10	50
gDNA Filter Midi Columns	2	10	50
1.5ml Collection Tubes	4	20	100
Buffer RLC	10 ml	60 ml	250 ml
Buffer PRC1	10 ml	60 ml	250 ml
Buffer PRC2	10 ml	60 ml	250 ml
Buffer RVV1	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer RVV2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	2 ml	10 ml	50 ml
说明书	1	1	1

版本号：202401

保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 18 个月。低温下, Buffer RLC/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 RW2 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 RLC/Buffer PRC1,按每 ml Buffer RLC/Buffer PRC1 加入 20 μ l β -巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP, 该混合液室温可保存 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 PRC1 中, 加入 PVP-40 至终浓度为 2% (W/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 RLC/PRC1 后, DNA 污染会加重, 建议 DNA 酶上消化法进一步去除 DNA。
- 受植物多样性影响, 且生不同生长发育阶段组织 RNA 含量差异显著, 初次实验时, 常规植物用 500mg, 富含粘液质的组织样品用 250mg 进行提取。根据实验结果调整样品用量, 易提取样品, 如玉米叶片、拟南芥叶片、水稻叶片等, 样品用量可高达 1g。
- 失败样品: 由于植物中代谢物质含量差异很大, 本方案虽然解决大部分的样品部分, 但本产品未能解决问题, 请订购 Buffer PSL 代替 Buffer RLC。

实验步骤

A. 简易的植物/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. 用液氮将植物或真菌样品研磨成细小粉末。称取 300~1000mg 粉末至 15ml 预冷的离心管中, 立即加入 5.0ml Buffer RLC 至样品中, 高速涡旋 15~30 秒打散样品。
研磨好的样品在称量、转移、存放或加入 RLC 之前都不能解冻, 否则 RNA 会降解。加入 Buffer RLC 后要立即涡旋 10-15 秒让样品充分分散, 成团样品用移液器吸打辅助分散, 然后再进行第二个样品研磨匀浆操作。
2. 室温下, 4,000~5,000 \times g 离心 10 分钟。
3. 把 gDNA Filter Midi Column 装在 15ml 收集管中, 转移 4ml 上清液转移至过滤柱中。

4,000~5,000 × g 离心 5 分钟，弃去 gDNA 过滤柱。

4. 加入 0.5 倍体积无水乙醇(~2ml)至滤液中，涡旋混匀 10 秒，按第 5 步进行操作。

B. 复杂的植物/真菌样品(多糖多酚类)

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. 用液氮将植物或真菌样品研磨成细小的粉末。称取 250~600mg 粉末至 15ml 预冷的离心管中，立即加入 5.0ml Buffer PRC1/β-ME，高速涡旋 10~15 秒打散样品。

研磨好的样品在称量、转移、存放或加入 RLC 之前都不能解冻，否则 RNA 会降解。加入 Buffer RLC 后要立即涡旋 10-15 秒让样品充分分散，成团样品用移液器吸打辅助分散，然后再进行第二个样品研磨匀浆操作。

2. 55°C 短暂水浴 3~5 分钟。室温下，4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。

处理富含淀粉类样品，加入裂解液后室温静置 3~5 分钟代替 55°C 水浴，以防止淀粉糊化。

3. 把 gDNA Filter Midi Column 装在 15ml 收集管中，转移 4ml 上清液转移至过滤柱中。

4,000~5,000 × g 离心 5 分钟，弃去 gDNA 过滤柱。

4. 加入等倍体积的 Buffer PRC2 至滤液中，涡旋混匀 10 秒。按第 5 步进行操作。

加入 Buffer PRC2 混匀后，若出现大量沉淀时，补加 2~3ml Buffer PRC1 混匀，减少沉淀量避免过柱时引起堵塞。同一种样品下次提取时，控制 Buffer PRC2 用量，加入 0.5 倍体积的 Buffer PRC2 或加入 0.5 倍体积的无水乙醇。

过柱纯化 RNA

4. 把 HiPure RNA Midi Column 装在 15ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。

4,000~5,000 × g 离心 3 分钟。

5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。4,000~5,000 × g 离心 3 分钟。

出现堵柱时，延长离心时间至 10 分钟。若堵柱情况没有解决，用移液器的枪头轻轻刮动数次让柱子中表层的滤膜刮破。

6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 4ml Buffer RW1 至柱子上。4,000~5,000 × g 离心 3 分钟

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 4ml Buffer RW2 至柱子中，4,000~5,000 × g 离心 3 分钟

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 4ml Buffer RW2 至柱子中，4,000~5,000 ×g 离心 3 分钟
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。4,000~5,000 ×g 离心 10 分钟
10. 将柱子转移至 15ml 离心管。加入 500µl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。4,000~5,000 ×g 离心 5 分钟。
11. 再加入 500µl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。4,000~5,000 ×g 离心 5 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80℃。

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℃ 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℃ 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 去除效果取决样品类型和用量。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。