

UE 植物总 RNA 小量制备试剂盒

本试剂盒用于从各种植物叶片、多糖块茎/根部/种子、水果果肉以及真菌中提取总 RNA。提取的总 RNA 分子完整、纯度高,适用于 Northern Blot、RT-PCR、体外翻译、Primer Extension、S1 核酸酶作图、RNase 保护测定、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-MN-PP -RNA-10	UE-MN-PP -RNA-50	UE-MN-PP -RNA-250
Kit size	10 preps	50 preps	250 preps
Spin Columns NP	10	50	250
gDNA removal Columns	10	50	250
Collection Tubes (2mL)	20	100	500
Buffer RL-1	8 ml	40 ml	200 ml
Buffer PL-1	8 ml	40 ml	200 ml
Buffer RW1	8 ml	40 ml	200 ml
Buffer RW2	3 ml	12 ml	60 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 ml	10 ml	30 ml
Protocol manual	1	1	1

Buffer RL-1：细胞裂解液 RL。室温密封贮存。低温下可能会有沉淀析出，需在 60℃水浴让沉淀完全溶解并冷却至室温后使用。

Buffer PL-1：细胞裂解液 PL。室温密封贮存。低温下可能会有沉淀析出，需在 60℃水浴让沉淀完全溶解并冷却至室温后使用。

Buffer RW1：洗涤液。室温密封贮存。

Buffer RW2：去盐液，为浓缩液，使用前须按试剂瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

中和液。室温密封贮存。

RNase-Free ddH₂O：RNA 洗脱液。室温密封贮存。

二、注意事项

- RNA 提取完成后建议置于冰上待用，若不能立刻进行后续实验，请保存于-80℃。
- RNA 分管尽快使用，电泳检测用无酶水进行冲洗，电泳缓冲液用 RNA 无酶水配置，提高电压并缩短跑胶时间。
- 选新鲜组织样本，避免反复冻融，组织离体后须迅速放入液氮中速存，后期转移至-80℃长期保存。
- 所有试剂用 DEPC 处理过的溶剂配制。请选用 RNase-free 枪头和离心管，以避免提取过程中 RNA 被 RNase 降解。

三、实验准备

- 自备试剂：无水乙醇（AR）、β-巯基乙醇或 DTT
- Buffer RW2 在使用前需按照试剂瓶标签所示加入无水乙醇进行稀释后使用；
- (可选)提升裂解液的变性能力：使用前分装适量 Buffer RL-1 或 Buffer PL-1 按每 mL Buffer RL-1 或 Buffer PL-1 加入 10μL β-巯基乙醇或 20μL 的 2M DTT，混合液室温可保存 1 月。β-巯基乙醇/DTT 能打断 RNase 分子间的二硫键,高效灭活 RNase,提高 RNA 质量。由于β-巯基乙醇/DTT 的毒性，多数情况下，不添加也可以得到完整的 RNA。
- 试剂盒提供多种裂解缓冲液：Buffer RL-1 和 Buffer PL-1，具体选择参考表 1。
- 若不确定植物种类，推荐优先尝试 Buffer PL-1。

样本种类	推荐样本量 /mg	样本示例	推荐裂解液	
			Buffer RL-1	Buffer PL-1
简单植物组织 (叶片、根、茎)	50-100	小麦、水稻、玉米、菠菜、 娃娃菜、豌豆苗、根茎	√	
多糖多酚植物叶片		桃叶、梅叶、梨叶、葡萄叶、 月季花瓣		√
淀粉含量高的植物 组织	20-50	玉米种子、红豆种子、土豆		√
油性高的植物组织		油菜籽	√	√
水果果肉	100-500	西瓜、苹果	√	
真菌	20-100	香菇、金针菇	√	√

表 1 不同种类样本推荐的样本处理量及裂解液

四、操作步骤

【样本前处理】

- 称取适量的组织样本,选择合适的组织匀浆方式进行匀浆(可选用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器、珠磨仪等工具，优选使用液氮研磨，低温液氮可保护 RNA 不降解)。
- 加入 700μL Buffer RL-1 或 Buffer PL-1 (已加入β-巯基乙醇或 DTT)，用一次性注射器或移液枪吹打裂解液 10~20 次，涡旋混匀 10 秒，12,000xg 或最高转速离心 5 分钟，转移上清液至新的离心管中，继续执行步骤 3。

注：在后续步骤中仅使用该上清液（裂解液），因为组织匀浆后未能被裂解液溶解的残余不溶物有可能导致柱子的堵塞。

【纯化步骤】

- 将上清液转移到放置在 2mL 收集管中的 gDNA removal Columns 中。12,000xg 离心 1 分钟。丢弃 gDNA removal Columns，保留滤液。
- 加入 0.5 倍体积的无水乙醇至滤液中，移液枪吹打 10~20 次，涡旋混匀 10 秒。
- 转移≤750μL 混合液(包含絮状沉淀)至已装在 2mL Collection Tube 中的 Spin Column NP 中，12,000xg 离心 1 分钟。弃去滤液，柱子装回收集管中。
- 1) 在该步骤及接下来的离心步骤中，应小心分离柱子和收集管，避免柱子与滤液接触；
2) 如果不小心滤液触碰到了柱子上的膜，可弃去滤液后再次 14,000xg 离心 1 分钟。
- 转移剩余混合液至柱子中，12,000xg 离心 1 分钟。弃去滤液，柱子装回收集管中。
- 加入 700μL Buffer RW1 至柱中，12,000xg 离心 1 分钟。弃去滤液，柱子装回收集管中。
- 加入 500μL Buffer RW2 至柱中，12,000xg 离心 1 分钟。弃去滤液，柱子装回收集管中。
- 加入 500μL Buffer RW2 至柱中，12,000xg 离心 1 分钟。弃去滤液，柱子装回收集管中。
- 12,000xg 空柱离心 3 分钟去除乙醇。

注：残留乙醇会影响后续酶促扩增反应，因此去除残留乙醇非常重要。

- 将柱子装在新的 1.5mL RNase-Free 离心管中，小心打开柱子的盖子，室温放置 3 分钟，向膜中央加入 30~100μL RNase-Free ddH₂O，室温静置 3 分钟。12,000xg 离心 1 分钟，收集溶液，保存于-20℃。