

目 录

一般实验室使用，仅用于 *体外*

通用植物总RNA提取试剂盒 (离心柱型)

目录号: **RP3301 (50次)** **RP3302 (100次)**

使用手册

2008年11月, 第1版

一、试剂盒组成、储存、稳定性.....	1
二、原理简介.....	2
三、试剂盒特点.....	2
四、注意事项.....	2
五、操作步骤.....	4
六、疑难解答.....	6



北京百泰克生物技术有限公司
Bioteke Corporation

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50次 (RP3301)	100次 (RP3302)
裂解液 PL	室温(-20℃长期)	55 ml	110 ml
去蛋白液 RE	室温	30ml	60ml
漂洗液 RW	4℃一个月 (-20℃长期)	15ml	25ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10ml	20ml
70%乙醇	室温	22.5ml RNase-free H ₂ O	45mlRNase-free H ₂ O
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-Free Dnase (仅 II 型提供)	-20℃	100ul	200ul
10×Reaction Buffer (仅 II 型提供)	-20℃	150ul	300ul
RNase-free 过滤柱	室温	50 个	100 个
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

注意事项

- 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
- 不合适的储存于低温（4℃或者-20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃-25℃）进行。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

二、原理简介

本产品是 BioTeke 自主开发的独特产品，其原理完全不同于异硫氰酸胍/酚/氯仿提取方法，克服了后者不能区分 RNA (本质上是多糖)和其他植物多糖的缺点，能高效将 RNA 和其他植物多糖分开，同时还能有效去除多酚和其他植物次级代谢成份，适合于绝大部分用 TRIZOL 和 QIAGEN Rneasy mini kit 无法提取的植物，并在近一百多种各类植物（包括十分棘手的松柏类植物）中得到验证。本产品还可以用于富含粘性糖蛋白的动物组织。

三、试剂盒特点

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
- 稳定性好、纯度高、方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
- 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
- 本试剂盒可以采用 DNase I 过柱消化 DNA。

四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分！）

- 为防止RNA降解，所有离心步骤如未加说明，均在4℃低温进行。使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
- 裂解液 PL 和去蛋白液 RE 中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，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。

3. 预防 RNase 污染，在实际的操作中应遵循以下指南（参见《分子克隆》）
 - * 全程佩戴一次性手套。皮肤经常带有细菌和霉菌，可能污染RNA的抽提并成为RNA酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。
 - * 使用灭菌的、一次性的塑料器皿和自动吸管抽提RNA，避免使用公共仪器所导致的RNA酶交叉污染。
 - * 使用无 RNA 酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在 150 °C 的烘箱中烘烤 4 小时，塑料器皿可以在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟，用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。
4. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析 RNA 的质量。好的 RNA 产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体 RNA 带，分别为~5Kb (28S)，~2Kb (18S)，条带亮度比值约为 2: 1。有时候也可以看到~0.1kb 和 0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到 4, 5 条带也属于正常现象，如果 RNA 未成熟的前体或者不均一核 RNA、小核 RNA 提取出来也可能看到介于 7Kb 和 15Kb 之间的不连续的高分子量条带。
5. 检测 OD_{260}/OD_{280} 吸光度比值时，RNA 样品应该溶于 TE 后检测，如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和 PH 值低，会使 OD_{280} 升高，从而使比值降低。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇!事先将裂解液 PL 65 °C 预热。

1. 匀浆处理

取 100mg 植物组织于液氮中研磨，时间要短，要保持研钵中有液氮（如果没有液氮也可以直接加 1ml 的裂解液 PL 后匀浆。组织样品容积不能超过 PL 容积的 10%）。

2. 转移样品至 1.5ml RNase free 离心管中，加入 1ml 的裂解液 PL 颠倒混匀，在 65 °C 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。

3. 室温条件下 12,000rpm 离心 10 分钟，小心取上清转入一个新的 RNase free 过滤柱中(若上清表面有漂浮物，用枪头跳开吸取下面液体即可)。

4. 10,000rpm 离心 45 秒。收集下滤液(含有总 RNA)于收集管中，进行下一步操作。

5. 在收集管中加入 1 倍体积 70%乙醇(请先检查是否已加入无水乙醇!)，颠倒混匀（此时可能会出现沉淀）。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中（溶液太多可分次过柱，吸附柱最多可以放 700μl 溶液，吸附柱套在收集管内）。

6. 10,000rpm 离心 45 秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。

7. 加入 500μl 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。

8. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制酶消化反应。

9. (可选步骤) 加入已配置好的消化液 30μl 于吸附膜的中间部位，37 °C 保温 15-30 分钟。消化液的配置比例：RNase-Free DNase 2ul，DNase

10×Reaction Buffer 3ul, RNase-Free Water 25ul; RNase-Free DNase 的用量可根据 DNA 量多少来调节, 1μlRNase-Free DNase 可以消化 1μg 的 RNA, 10×Reaction Buffer 的量按照比例增减。

10. 加入 500μl 去蛋白液 RE, 室温放置 2 分钟, 12,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液。
11. 加入 500μl 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。
12. 重复步骤 11。
13. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
14. 取出吸附柱 RA, 放入一个 RNase-free 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 50-80μl RNase-free water (事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。如果需要较多 RNA, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心 1 分钟, 或者另外再加 30μl RNase-free water, 离心 1 分钟, 合并两次洗脱液。
洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 RNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积最好不少于 30μl, 体积过小降低 RNA 洗脱效率, 减少 RNA 产量。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
产量低	样品裂解或者匀浆不彻底	液氮研磨的时候尽量研磨完全, 加入裂解液 PL 后剧烈震荡或者用枪头吹打帮助裂解。匀浆步骤可以提高产量。新鲜组织或者植物组织可以不需液氮, 直接在干净研钵内加入适量裂解液 PL 直接研磨。
	使用的样品或者裂解物在 -20°C 或者 -70°C 存放太久	存放时间过长可能降低 RNA 产量, 应尽快处理样品或者裂解物。
	组织本身含 RNA 少	不同类型的组织和细胞含有不同量的 RNA, 对于含量少的组织应该适当提高起始处理量。
	超过了吸附柱的最大吸附能力	同一个样品使用多个吸附柱, 然后合并得到 RNA。
	漂洗液 RW 内忘记加乙醇	第一次实验时, 漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇。
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ 吸光度比值 < 1.6	分光光度计检测吸光度时, RNA 样品不是溶于 TE, 而是溶于水。低离子浓度和低 pH 条件下, OD ₂₈₀ 值会较高, 造成比值低。	检测时用 TE 稀释样品

接前表

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
	污染了蛋白或者苯酚	
RNA降解, 完整性不佳	RNA 提取所用各种物品和试剂没有灭活 RNA 酶	按照注意事项准备 RNA 提取的各种用品。
	组织取出后没有马上处理或冷冻, 提取前已经降解	组织应该尽量立刻处理, 不能及时处理的应该尽快保存于 RNAfixer、液氮或者-70℃。
	提取的 RNA 样品没有保存在-20℃或-70℃低温	尽可能的将 RNA 保存在-70℃的低温。
	样品提取过程中降解	提取动作应该尽可能的快, 离心应该低温进行, 取用 RNA 时尽量冰上进行。
下游的RT-PCR实验不成功	忘记做步骤 10, 或者将吸附柱取出时下端碰到了收集管里面的漂洗液, 造成洗脱下来的 RNA 含有乙醇, 乙醇抑制了逆转录反应	确保做了步骤 10, 然后小心取出吸附柱, 可以在空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。



北京百泰克生物技术有限公司
BioTeke Corporation

地 址: 北京海淀区留学人员创业园

电 话: 010-62951781

传 真: 010-62951781

网 址: www.bioteke.com

Email: info@bioteke.com