



# Plant Total RNA Isolation Kit

## Plant Total RNA Isolation Kit

For purification of total RNA from general plant samples containing low polysaccharide and polyphenol components

## Plant Total RNA Isolation Kit Plus

For purification of total RNA from general plant samples containing high polysaccharide and polyphenol components

Research use only

Store at room temperature



## 目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	4
RNA 的应用	4
RNA 的储存	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
产品信息	6
储存条件	6
RNA-Only Column 特性	7
DNA-Cleaning Column 特性	7
RNA 提取得率与纯度	8
RNA 完整性	9
RNA 洗脱回收效率	10
注意事项	11
操作前准备事项	12
实验材料和设备	12
自备试剂	12
安全性	12
操作指南	13
样本选取和保存	13
样本初始用量	13
植物组织破碎	14
RNA 污染预防	14
基因组 DNA 污染及清除	14
● Plant Total RNA Isolation Kit 操作步骤	15
● Plant Total RNA Isolation Kit Plus 操作步骤	17
RNA 浓度及纯度检测	19
DNA 污染及检测	19
快速操作示意图	20
问题分析指南	22

## 产品介绍

该试剂盒采用本公司研制的离心柱和配方，可以从各种植物组织中高效率的提取得到高纯度高质量的总 RNA；如果植物样本多糖多酚，建议使用 Plant Total RNA Isolation Kit Plus 以得到更好的 RNA 提取效果。提供 DNA-Cleaning Column 能轻松的让上清液和组织裂解物分离，去除样品中的 DNA，操作简便、省时； RNA-only Column 能高效的结合 RNA，搭配独特的配方，可以同时处理大量样品。

全体系 RNase-Free，使得提取的 RNA 无降解； Buffer PRW1、Buffer PRW2 缓冲液洗涤体系，使得获得的 RNA 无蛋白、无 DNA、无离子、无有机化合物污染。

## 产品特点

- ◆ 整套试剂盒 RNase-Free，无需担心 RNA 降解。
- ◆ Plant Total RNA Isolation Kit Plus 特别适合于多糖多酚植物样本 RNA 的纯化。
- ◆ RNA 得率高：RNA-only Column 和独特配方搭配能高效的纯化 RNA。
- ◆ 速度快：操作简便，可在 30 分钟内完成。
- ◆ 安全：无需有机试剂抽提。
- ◆ 质量高：提取得到的 RNA 片段纯度高，没有蛋白和其他杂质污染，能够满足下游各种实验应用。

## 试剂盒应用

适用于多种新鲜或冻存的植物组织样本（尤其是新鲜植物叶片组织）总 RNA 的提取纯化。

## RNA 的应用

植物总 RNA 提取系列试剂盒提取得到的总 RNA 可用于各种下游分子实验,例如:cDNA 合成, RT-PCR、Real Time PCR、Northern Blot、Dot Blot、体外翻译、芯片分析、PolyA 筛选、分子克隆和 RNase 保护分析等。

## RNA 的储存

建议使用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 洗脱 RNA, 即时用于下游实验或储存于-70°C。在以上存储条件下, RNA 可保存一年。

## 产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System), 每一批次的植物总 RNA 提取系列试剂盒都严格进行多次测试, 确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

## 试剂盒内容

Plant Total RNA Isolation Kit 植物组织总 RNA 提取试剂盒				
试剂盒组成	RE-0501T	RE-05011	RE-05012	RE-05013
		5 次	50 次	100 次
Buffer PRL1*	3ml	30ml	60ml	150ml
Buffer PRL2	1.9ml	22ml	38ml	90ml
Buffer PRW1*	3ml	30ml	60ml	150ml
Buffer PRW2	2.4ml	24ml	48ml	120ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	1.5ml	10ml	20ml	50ml
RNA-only Column	5 个	50 个	100 个	250 个
DNA-Cleaning Column	5 个	50 个	100 个	250 个
收集管	10 个	100 个	200 个	500 个
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份

\*: Buffer PRL1、PRW1中含有具刺激性的离液盐，操作时请注意戴上手套和进行相关防护措施。

Plant Total RNA Isolation Kit Plus 多酚多糖植物总 RNA 提取试剂盒				
试剂盒组成	RE-0502T	RE-05021	RE-05022	RE-05023
		5 次	50 次	100 次
Buffer PSL1*	3ml	30ml	60ml	150ml
Buffer PS	600µl	6ml	12ml	30ml
Buffer PSL2	2.4ml	24ml	48ml	120ml
Buffer PRW1*	3ml	30ml	60ml	150ml
Buffer PRW2	2.4ml	24ml	48ml	120ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	1.5ml	10ml	20ml	50ml
RNA-only Column	5 个	50 个	100 个	250 个
DNA-Cleaning Column	5 个	50 个	100 个	250 个
收集管	10 个	100 个	200 个	500 个
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份

\*: Buffer PSL1、PRW1中含有具刺激性的离液盐，操作时请注意戴上手套和进行相关防护措施。

## 产品信息

型号	离心柱型	纯化组件	Foregene 离心柱、试剂
通量	1-24 个样品	制备时间	~30min (24 个样品)
离心机	台式离心机	植物裂解物分离	离心分离
纯化柱 RNA 承载量	80µg	离心柱液体盛装量	700µl
洗脱体积	50-200µl	植物样本处理量	50mg

## 储存条件

本试剂盒在常温（15–25°C）干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于 2–8°C。Buffer PRL1 在加入 β-巯基乙醇后可在 4°C 放置 1 个月（建议现做现添加）。

## 试剂盒组分信息

- ◆ Buffer PRL1、Buffer PSL1：提供植物组织研磨裂解所需的环境。
- ◆ Buffer PS：补充多糖多酚植物组织裂解反应所需的环境。
- ◆ Buffer PRL2、Buffer PSL2：提供 RNA 的特异上柱环境。
- ◆ Buffer PRW1：去除 RNA 中的蛋白质、DNA 等杂质。
- ◆ Buffer PRW2：去除 RNA 中残留的盐离子。
- ◆ RNase-Free ddH<sub>2</sub>O：洗脱纯化柱膜上的总 RNA。
- ◆ DNA-Cleaning Column：特异吸附组织裂解产物中的 DNA，并过滤除去裂解产物中的固体杂质。
- ◆ RNA-only Column：特异吸附上通过 DNA-Cleaning Column 滤液中的总 RNA。

## RNA-Only Column 特性

RNA最大结合能力(Maximum binding capacity)	80µg
上清最大载量体积(Maximum loading volume)	700µl
RNA片段大小分布(RNA size distribution)	RNA≥200nt
最小洗脱体积(Minimum elution volume)1*	50µl
最佳样本选取(Selection of samples)	新鲜幼嫩叶片
样本最大初始量(Maximum amount of starting material)2*	50mg

1\*: 50µl 的最小洗脱体系是在兼顾 RNA 回收率及浓度给出的比较合理的建议体积。如果为了提高 RNA 的产量,可以适当增加洗脱液体积;如果为了提高纯化得到的 RNA 浓度,在牺牲一部分 RNA 得率的前提下,适当的减少洗脱液体积,比如采用 30µl 的洗脱体系,以期得到更高浓度的 RNA。

2\*: 更大的样本量,请使用多个 RNA-Only Column 进行 RNA 纯化。

## DNA-Cleaning Column 特性

原理( Mechanism)	特异吸附DNA
功能(Function)	去除DNA污染, 过滤分离裂解物
裂解物最大载量体积(Maximum loading volume)	700µl

## RNA 提取得率与纯度

使用植物总 RNA 提取系列试剂盒可以从多种植物组织中纯化得到的 RNA，其产量与植物样本本身、样本初始量、样本新鲜程度、样本保存时间以及操作相关。以下是使用该试剂盒提取 RNA，各种植物样本用量 50mg 其 RNA 得率与纯度，实际操作中，可能与该数据有些许出入。

### A: Plant Total RNA Isolation Kit 处理多糖多酚含量低的植物样本。

新鲜幼嫩叶片	总 RNA 产量( $\mu\text{g}$ )	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>
烟草	27-30	1.8-2.1	1.8-2.1
番茄	32-35	1.8-2.1	1.8-2.1
大豆	31-34	1.8-2.1	1.8-2.1
玉米	15-17	1.8-2.1	1.8-2.1
油菜	8-10	1.8-2.1	1.8-2.0
水稻	15-17	1.8-2.1	1.8-2.1

注意：以上数据均得自于植物新鲜叶片，若是植物叶片较老，或是植物其他部位（如叶脉、根茎等），抑或是样本保存时间过久，RNA 的得率或低于上表中数据。

### B: Plant Total RNA Isolation Kit Plus 处理多糖多酚含量高的植物样本。

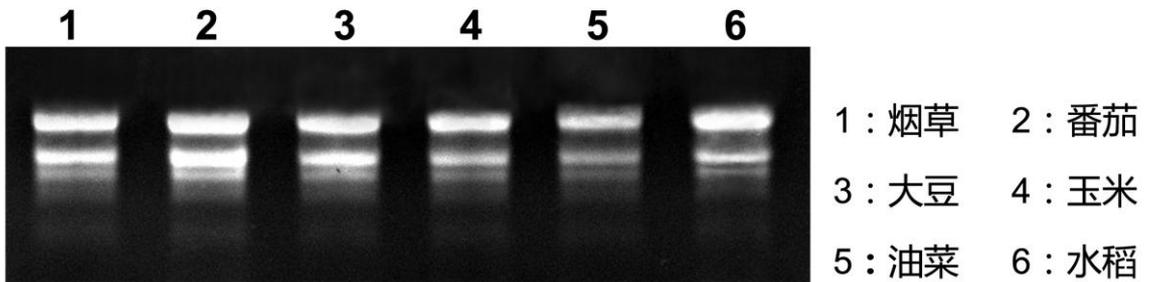
新鲜幼嫩叶片	总 RNA 产量( $\mu\text{g}$ )	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>
香蕉	18-20	1.8-2.1	1.8-2.1
银杏	18-20	1.8-2.1	1.8-2.1
棉花	12-15	1.8-2.1	1.8-2.1
石榴	21-23	1.8-2.1	1.8-1.9

注意：以上数据均得自于植物新鲜叶片，若是植物叶片较老，或是植物其他部位（如叶脉、根茎等），抑或是样本保存时间过久，RNA 的得率或低于上表中数据。

## RNA 完整性

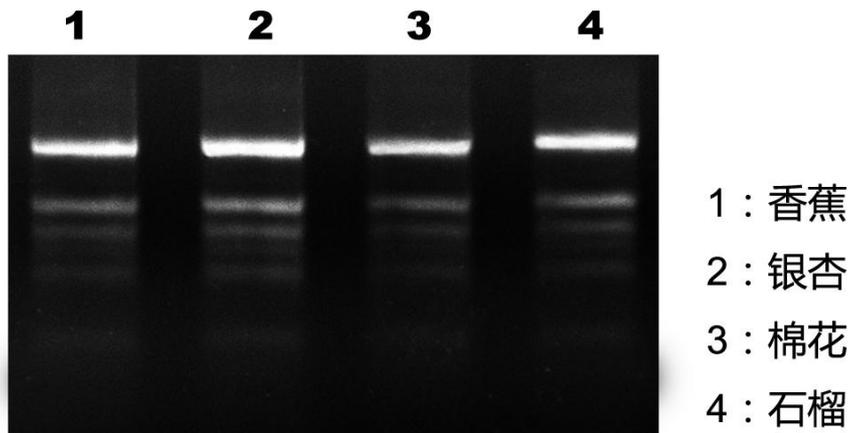
RNA 的质量可以通过变性琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色之后在紫外光下分析。在凝胶上，核糖体 RNA 的带型应明显并清晰；28S RNA 与 18S RNA 亮度比应约为 2:1。植物叶片中由于含有大量的叶绿体 RNA，可见 4 条或更多 rRNA。如果任何泳道的核糖体 RNA 或者特定的样品条带显示不明显、不清晰，弥散成小片段 RNA 或者消失，则可能是样本在处理之前已经发生 RNA 降解或者在纯化过程中造成了 RNA 降解。

A: 下图为福际生物 Plant Total RNA Isolation Kit 处理植物样本，获得的 RNA 电泳图。



Plant Total RNA Isolation Kit处理不同植物新鲜叶片 50mg，取5%纯化后的RNA电泳检测。

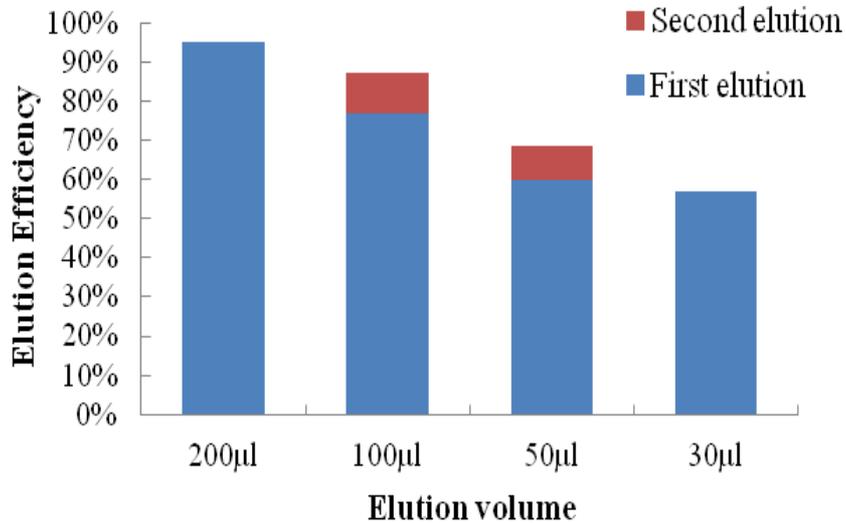
B: 下图为福际生物 Plant Total RNA Isolation Kit Plus 处理植物样本，获得的 RNA 电泳图。



Plant Total RNA Isolation Kit Plus处理多酚多糖植物新鲜叶片50mg，取5%纯化后的RNA电泳检测。

## RNA 洗脱回收效率

经过严格多次实验，我们发现纯化 RNA 的洗脱回收效率与洗脱体系、洗脱次数有关，具体数据见下图表。根据图上所给出的洗脱效率，用户可以根据自己的实验需要选择合适的洗脱体系，以期得到可观的产量的 RNA 及期望的 RNA 浓度。



注意：上图洗脱回收效率仅供参考，具体的回收洗脱得率以最终实验结果为准，可能会与上图数据有些许出入，偏差在 10-20%属于正常情况。

**注意事项**：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 RNA 降解且提取量也会下降。
- ◆ 新鲜植物叶片的用量不要超过 50mg，否则会影响 RNA 产量和纯度。
- ◆ 试剂盒使用前，请在 Buffer PRL2 或 Buffer PSL2 中添加 100%的无水乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。不同规格的试剂盒无水乙醇的添加量见下表：

**A: Plant Total RNA Isolation Kit 中 Buffer PRL2 无水乙醇添加表**

产品规格	100%无水乙醇添加量
RE-0501T	3.5ml
RE-05011	40ml
RE-05012	70ml
RE-05013	165ml

**B: Plant Total RNA Isolation Kit Plus 中 Buffer PSL2 无水乙醇添加表**

产品规格	100%无水乙醇添加量
RE-0502T	3ml
RE-05021	30ml
RE-05022	60ml
RE-05023	150ml

- ◆ 试剂盒使用前，请在 Buffer PRW2 中添加 100%的无水乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。不同规格的试剂盒无水乙醇的添加量见下表：

产品规格	100%无水乙醇添加量
RE-0501T & RT-0502T	6ml
RE-05011 & RT-05021	60ml
RE-05012 & RT-05022	120ml
RE-05013 & RT-05023	300ml

- ◆ RNA 产率和质量与植物组织样本用量和洗脱体积有关，建议每 500 $\mu$ l Buffer PRL1 或 Buffer PSL1 使用组织量 50mg。
- ◆ 洗脱体积：洗脱液体积不应少于 50 $\mu$ l，否则会影响 RNA 回收效率。
- ◆ 所有实验步骤若非特别指出，均在常温(15-25 $^{\circ}$ C)进行。
- ◆ 请检查试剂盒中的 Buffer PRL1、Buffer PSL1 和 Buffer PRW1 是否有晶体析出现象，低温存放或室温较低试剂可能会有晶体析出，可将 Buffer 放置于室温或 37 $^{\circ}$ C 一段时间，将晶体溶解后混匀再使用。

## 操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。植物总 RNA 提取系列试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

## 实验材料和设备

- ◆ 植物组织：50mg 新鲜叶片。
- ◆ 液氮、研钵。
- ◆ 台式离心机 ( $\geq 13,400\times g$ )、移液器等。
- ◆ 无菌 RNase-Free 离心管、枪头等。
- ◆ 一次性乳胶手套。

## 自备试剂

- ◆ 100%无水乙醇
- ◆  $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -ME)

## 安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 在使用该试剂盒时，请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩等以保护自身；并最大程度上避免人为引入的 RNase 污染。
- ◆ Buffer PRL1、Buffer PSL1 含有离液盐：变性剂，刺激性。
- ◆ Buffer PRL2、Buffer PSL2、Buffer PRW2 含有乙醇：易燃。
- ◆ Buffer PRW1 含有离液盐：变性剂，刺激性。

## 操作指南

由于植物样本中的多酚多糖的含量不同，我们提供了多糖多酚植物样本的操作说明和普通植物样本的操作说明，请根据样本选择适当的操作步骤进行相关实验。

### 样本选取和保存

样本的选择及保存很大程度上决定着 RNA 的产量。应尽可能的采用植物新鲜的幼嫩叶片进行 RNA 提取（这个阶段叶片的含有的 RNA 丰度高，且幼嫩的叶片容易进行后处理）。

当样本采集之后，RNA 很快会发生降解；如果采集的样本来不及提取 RNA，请尽快妥善保存。我们建议新采集的样本应立即放入液氮中速冻，之后长期保存于 $-70^{\circ}\text{C}$ 并避免样本的反复冻融；或者将样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNeasy 溶液中（动物样本）。为了避免 RNA 的降解，样本的采集与保存应尽可能迅速的进行。

### 样本初始用量

正确的样本的初始取用量对于 RNA 的最佳产量及纯度十分必要，样本的最大取用量与下面因素相关：

- 1、样本本身的类型以及样本 RNA 的丰度；
- 2、Buffer PRL1 或 Buffer PSL1 的用量决定了样本的有效裂解；
- 3、RNA-Only Column 的 RNA 结合能力。

根据上述因素，参照 50mg 样本 RNA 得率表，我们推荐样本的初始用量不宜超过 50mg。如果样本用量过多，Buffer PRL1 或 Buffer SL1 对组织裂解不完全，导致纯化获得的 RNA 纯度不高；同时可能会超过 RNA-Only Column 的最大承载量而浪费珍贵样本。

## 植物组织破碎

使用液氮和研钵在低温条件下，利用机械剪切力快速破碎植物细胞。这一步操作一定要迅速，一旦植物细胞被破坏，RNA 会快速降解。因此，我们建议首先准备好 PRL1（已经添加了正确比例的  $\beta$ -ME，具体方法见操作说明第一步），再进行样本破碎，并将破碎好的样本迅速转移到 Buffer PRL1 中混合均匀。

样本破碎要彻底，以完全破坏细胞壁、细胞膜及细胞器以释放 RNA，否则将影响 RNA 的产量以及在下步进行裂解物分离操作（见操作步骤第四步骤）容易发生离心柱堵塞。

## RNase 污染预防

- ◆ 人体接触是重要的 RNase 污染源，且部分试剂中可能带有刺激性气味，请在操作过程中经常更换手套，并佩戴一次性口罩。
- ◆ 请使用无 RNase 的枪头和其他塑料制品。
- ◆ RNA 在 Buffer PRL1 中时不会被 RNase 污染，但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150°C 烘烤 4 小时，塑料制品可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，高压灭菌，即可去除 RNase。
- ◆ 配制溶液应使用无 RNase 的水（将水加入处理过不含 RNase 的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.01% (v/v)，混匀后放置过夜，高压灭菌）。

## 基因组 DNA 污染及清除

植物总 RNA 提取系列试剂盒主要是为了从植物组织中获得可观的 RNA，并且有独特的 DNA-Cleaning Column 可有效的除去体系中大部分 DNA 污染，纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase 处理即可有用于下游操作。某些 RNA 分析实验对痕量 DNA 十分敏感，比如：荧光定量 RT-PCR 分析低丰度基因，这时可以选用合适的 DNase 进一步清除 DNA 污染。

## Plant Total RNA Isolation Kit 操作步骤 (多糖多酚含量低的植物样本)

使用前请先在 **Buffer PRL2** 和 **Buffer PRW2** 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取 **500 $\mu$ l** Buffer PRL1 于 2ml 离心管中，加入 **10 $\mu$ l**  $\beta$ -巯基乙醇（需自备），混匀待用。
2. 取适量新鲜植物叶片或组织，尽量剪碎，置于预冷的研钵中，加入液氮充分研磨。
3. 迅速称取 **50mg** 研磨好的新鲜植物叶片粉末，转移至 Buffer PRL1 中，剧烈震荡混匀，室温静置 5min。

注意：组织量不要超过 **50mg**，否则会导致 RNA 的质量下降。在植物叶片粉末融化之前速度转移，细胞破碎后，在无冷冻环境中，RNA 极容易发生降解。

4. 将所有液体转移至 DNA-Cleaning Column 中（DNA-Cleaning Column 放入收集管中），13,300rpm (~17,000 $\times$ g) 离心 2min。移除 DNA-Cleaning Column，保留收集管内上清液。

注意：植物组织裂解液比较粘稠，在转移液体时可以将枪头尖端剪掉，便于取样。虽然大部分的细胞碎片被截留在 DNA-Cleaning Column 膜上，但是还是会有一些微量的细胞碎片会通过 DNA-Cleaning Column，在收集管底部以沉淀形式存在。

小心地将上清液转移至干净离心管中再进行步骤 5，切勿将沉淀吸入上清液中。

5. 小心转移经过 DNA-Cleaning Column 离心过滤的上清液到 2ml 新的 RNase-Free 离心管（需自备）中，向其中（体积应约为 500 $\mu$ l 上清液）中加入 **1.7 倍（约 850 $\mu$ l）** 体积 Buffer PRL2（使用前请确认已按照说明加入无水乙醇），轻柔混匀以备下面 RNA 纯化步骤使用。如果出现沉淀，切勿进行离心操作。

注意：Buffer PRL2 加入量请按照实际操作过程中上清液的体积进行比例换算加入。例如：500 $\mu$ l 上清液中加入 850 $\mu$ l Buffer PRL2（已加入无水乙醇）。混合液可能出现浑浊或絮状沉淀，请直接进行步骤 6 即可。

6. 将 **700 $\mu$ l** 上述混合液小心转移至 RNA-only Column 中（RNA-only Column 放入收集管中），轻轻盖上离心柱盖子，12,000rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1min，弃掉收集管中的废液。

注意：如果混合液中出现絮状沉淀，请将沉淀一并转移至 RNA-only Column 中。

7. 将 RNA-only Column 放回收集管中，将剩余混合液全部加入 RNA-only Column 中，12,000rpm(~13,400 $\times$ g)，离心 1min，弃掉收集管中的废液。

8. 向 RNA-only Column 中加入 **500 $\mu$ l** Buffer PRW1, 轻轻盖上离心柱盖子, 12,000rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1min, 弃掉收集管中的废液。

注意: 离心完成后, 小心的移走 RNA-only Column, 不要是离心柱底部碰触后收集管内的过滤液。以下步骤 9、10、11 均需注意此细节。

9. 向 RNA-only Column 中加入 **700 $\mu$ l** 无水乙醇, 12,000rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1min, 弃掉收集管中的废液。

10. 向 RNA-only Column 中加入 **700 $\mu$ l** Buffer PRW2 (使用前请确认已按照说明加入无水乙醇), 12,000rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1min, 弃掉收集管中的废液。

11. 重复步骤 10。

12. 将 RNA-only Column 放回收集管中, 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 空管离心 2min, 弃掉收集管。

注意: 长时间的空管离心以保证清除干净离心柱上的残留乙醇, 乙醇残留将会影响下游实验。

13. 将 RNA-only Column 转移至新的离心管中, 向 RNA-only Column 的膜中央滴加 **50-200 $\mu$ l** 已于 65 $^{\circ}$ C 预热的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 室温放置 2min。12,000rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1min 收集 RNA 溶液。

注意: RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 加入体积不应低于 50 $\mu$ l, 体积过小会影响洗脱效率。为提高 RNA 产量, 可将离心得到的 RNA 溶液重新加至 RNA-only Column 中, 重复步骤 13。具体的洗脱效率及 RNA 浓度之间的关系见第六页的“RNA 洗脱回收效率”图表。

得到的 RNA 溶液可直接用于下游实验或置于 -70 $^{\circ}$ C 保存。由于本试剂盒对 RNA 二级结构保护较好, 建议凝胶电泳之前, 先将得到的 RNA 溶液置于 72 $^{\circ}$ C 变性处理 5-10min。

## Plant Total RNA Isolation Kit Plus 操作步骤 (多糖多酚含量高的植物样本)

使用前请先在 **Buffer PSL2** 和 **Buffer PRW2** 中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶上的标签。

1. 将取 **500 $\mu$ l** Buffer PSL1 于 2ml 离心管中, 加入 **10 $\mu$ l**  $\beta$ -巯基乙醇, 混匀待用。
2. 取适量新鲜植物叶片或组织, 尽量剪碎, 置于预冷的研钵中, 加入液氮充分研磨。
3. 迅速称取 **50mg** 研磨好的新鲜植物叶片或组织粉末, 转移至 Buffer PSL1 中, 剧烈震荡混匀, 室温静置 5min。  
注意: 组织量不要超过 50mg, 否则会导致 RNA 的质量下降。在植物叶片粉末融化之前速度转移, 细胞破碎后, 在无冷冻环境中, RNA 极容易发生降解。
4. 向上述液体中加入 **100 $\mu$ l** Buffer PS, 轻柔混匀。
5. 将所有液体转移至 DNA-Cleaning Column 中 (DNA-Cleaning Column 放入收集管中), 13,300rpm (~17,000 $\times$ g) 离心 2min。移除过滤柱, 保留收集管内上清液。  
注意: 植物组织裂解液比较粘稠, 在转移液体时可以将枪头尖端剪掉, 便于取样。虽然大部分的细胞碎片被截留在 DNA-Cleaning Column 膜上, 但是还是会有一些微量的细胞碎片会通过 DNA-Cleaning Column, 在收集管底部以沉淀形式存在。小心地将上清液转移至干净离心管中再进行步骤 5, 切勿将沉淀吸入上清液中。
6. 小心转移经过 DNA-Cleaning Column 离心过滤的上清液到 2ml 新的 RNase-Free 离心管 (需自备) 中, 向其中 (体积应约为 600 $\mu$ l 上清液) 加入 **1.5 倍** 体积 Buffer PSL2 (使用前请确认已按照说明加入无水乙醇), 轻柔混匀以备下面 RNA 纯化步骤使用。  
如果出现沉淀, 切勿进行离心操作。  
注意: Buffer PSL2 加入量请按照实际操作过程中上清液的体积进行比例换算加入。例如: 600 $\mu$ l 上清液中加入 900 $\mu$ l Buffer PSL2 (已加入无水乙醇)。混合液可能出现浑浊或絮状沉淀, 请直接进行步骤 7 即可。
7. 将 **800 $\mu$ l** 混合液转移至 RNA-only Column 中 (RNA-only Column 放入收集管中), 12,000rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1min, 弃掉收集管中的废液。  
注意: 如果混合液中出现絮状沉淀, 请将沉淀一并转移至 RNA-only Column 中。
8. 将 RNA-only Column 放回收集管中, 将剩余混合液全部加入 RNA-only Column 中, 12,000rpm (~13,400 $\times$ g), 离心 1min, 弃掉收集管中的废液。
9. 向 RNA-only Column 中加入 **500 $\mu$ l** Buffer PRW1, 12,000rpm (~13,400 $\times$ g) 离心

1min, 弃掉收集管中的废液。

注意: 离心完成后, 小心的移走 RNA-only Column, 不要是离心柱底部碰触后收集管内的过滤液。以下步骤 9、10、11 均需注意此细节。

10. 向 RNA-only Column 中加入 **700 $\mu$ l** 无水乙醇, 12,000rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1min, 弃掉收集管中的废液。
11. 向 RNA-only Column 中加入 **700 $\mu$ l** Buffer PRW2 (使用前请确认已按照说明加入无水乙醇), 12,000rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1min, 弃掉收集管中的废液。
12. 重复步骤 11。
13. 将 RNA-only Column 放回收集管中, 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 空管离心 2min, 弃掉收集管。

注意: 长时间的空管离心以保证清除干净离心柱上的残留乙醇, 乙醇残留将会影响下游实验。
14. 将 RNA-only Column 转移至新的离心管中, 向 RNA-only Column 的膜中央滴加 **50-200 $\mu$ l** 已于 65 $^{\circ}$ C 预热的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 室温放置 2min。12,000rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1min 收集 RNA 溶液。

注意: RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 加入体积不应低于 50 $\mu$ l, 体积过小会影响洗脱效率。为提高 RNA 产量, 可将离心得到的 RNA 溶液重新加至 RNA-only Column 中, 重复步骤 14。具体的洗脱效率及 RNA 浓度之间的关系见 “RNA 洗脱回收效率” 图表。

得到的 RNA 溶液可直接用于下游实验或置于 -70 $^{\circ}$ C 保存。由于本试剂盒对 RNA 二级结构保护较好, 建议凝胶电泳之前, 先将得到的 RNA 溶液置于 72 $^{\circ}$ C 变性处理 5-10min。

## RNA 浓度及纯度检测

- ◆ 得到的 RNA 的质量与操作过程中的多种因素有关。RNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。由于本试剂盒对 RNA 二级结构保护较好，建议凝胶电泳之前，先将得到的 RNA 溶液置于 72°C 变性处理 5-10min。
- ◆ 用分光光度计测定 RNA 浓度，为了测量的精确性，请确保 OD<sub>260</sub> 的读数值大于 0.15。在中性条件下，OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 44μg/ml 的 RNA。微量 RNA 用分光光度法很难精确的定量，可以使用定量 RT-PCR，或者荧光定量。
- ◆ RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值通常用作核酸纯度的衡量指标，一般情况下，纯 RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.8-2.1。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值会受测定所用溶液的 pH 值的影响，例如，纯化 RNA 在 pH 7.5 的 10mM Tris-HCl 缓冲液中 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 读数在 1.9-2.1 之间，而在中性的水溶液中比值会变低，可能只有 1.8-2.0，这并不意味着 RNA 的质量变差。

## DNA 污染及检测

目前没有有效的纯化方法能保证纯化得到的 RNA 中完全没有 DNA 的污染，即便在凝胶电泳时检测不到 DNA 条带，也可能存在微量的 DNA。而 RNA 提取试剂盒能除去 RNA 中的绝大部分 DNA，然而微量的 DNA 依然可能存在于样品中，它的存在量与样本的用量及其本身性质有关。

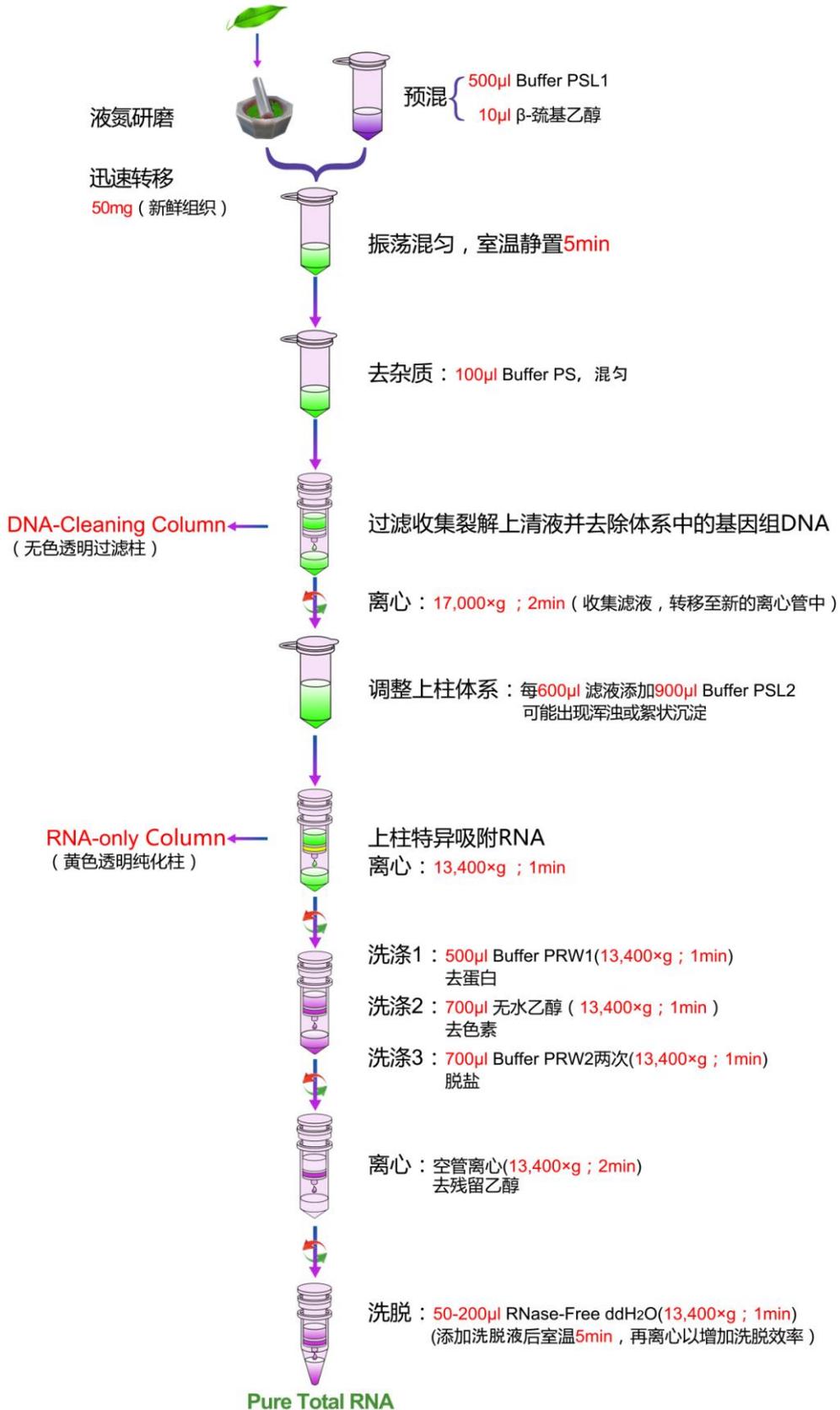
对于纯化得到的 RNA 中的微量 DNA 的检测，可以通过不经逆转录进行实时荧光定量 PCR 检测。我们建议，可以设计引物，其退火匹配区域位于基因组 DNA 的内含子中。如果 RNA 中不含有任何基因组 DNA，基于这对引物的 PCR 是不会扩增出相应的 PCR 产物。

## 快速操作示意图

## 普通植物总 RNA 提取操作示意图



## 多糖多酚植物总 RNA 提取操作示意图



## 问题分析指南

以下针对植物总 RNA 提取中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题分析以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-66070618 或 E-mail:

[Tech@foregene.com](mailto:Tech@foregene.com)。

### 离心柱发生堵塞

离心柱发生堵塞之后会造成 RNA 得率降低甚至不能纯化得到 RNA，同时提起得到的 RNA 质量低下。

常见原因分析：

#### 1. 样本破碎不彻底。

样本破碎不彻底会使 DNA-Cleaning Column 发生堵塞，同时会影响 RNA 得率及质量。我们建议在进行样本破碎的时候，在足量的液氮中快速研磨操作，尽量破碎样本细胞壁、细胞膜等组织。对于多酚多糖的植物样本，我们建议您使用 Plant Total RNA Isolation Kit Plus。

#### 2. 吸取 DNA-Cleaning Column 分离后的上清液时，吸入了可能的细胞碎片沉淀物。

吸取的细胞碎片沉淀物会使在进行 RNA 吸附操作时（见操作步骤第 5 步），将会堵塞 RNA-only Column。我们建议在吸取该上清时一定要小心谨慎，以避免细胞碎片被吸取。

#### 3. 样本初始量过多。

样本使用量过多将会造成样本破碎不完全或者 Buffer PRL1 或 Buffer PSL1 裂解细胞时不完全，导致纯化操作是纯化柱堵塞。Plant Total RNA Isolation Kit 每单次纯化操作样本的初始最大量为 50mg。对于多酚多糖的植物样本，我们建议您试用 Plant Total RNA Isolation Kit Plus。

#### 4. 离心机的温度过低。

整个 RNA 分离纯化除了液氮破碎样本组织外，所有的步骤均在常温（20-25℃）进行。有些低温离心机的温度低于 20℃，可能会造成 DNA-Cleaning Column 和（或）RNA-only Column 的堵塞。如果发生这种现象，请将离心机温度设置到 20-25℃，并将裂解混合物和（或）添加了乙醇分离上清预热到 37℃。

## 提取不到 RNA 或者 RNA 产量低

通常会有多种因素影响回收效率，比如：样本 RNA 含量、操作方法、洗脱体积等。

### 常见原因分析：

1. 样本保存不当或样本保存时间过久导致 RNA 已经降解。

建议：新采集的样本应立即放入液氮中速冻，之后长期保存于-70°C并避免样本的反复冻融；或者将样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNeasy Lysis Buffer 溶液中（动物样本）。

2. 样本破碎裂解不充分导致纯化柱堵塞。

建议：在组织研磨时，请保证组织充分研磨，并在研磨完成后迅速转移至预先准备好的 Buffer PRL1 或 Buffer PSL1（确认已添加正确比例的  $\beta$ -ME，见操作步骤第 1 步）中。

3. 洗脱液添加不正确。

建议：确认 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 滴加到了纯化柱膜中间位置。

4. Buffer PRL2、Buffer PSL2 或 Buffer PRW2 中没有添加正确体积的无水乙醇。

建议：请按照说明书，在试剂盒使用前，Buffer PRL2、Buffer PSL2 和 Buffer PRW2 中添加正确体积的无水乙醇并混匀。

5. 组织样本用量不合适。

建议：每 500 $\mu$ l Buffer PRL1 或 Buffer PSL1 使用组织量为 50mg，组织使用过多会导致 RNA 提取量降低并且得到的 RNA 纯度也会降低。我们强烈建议每单次 RNA 提取操作，样本初始用量一定不要超过 50mg。

6. 洗脱体积不合适或洗脱不彻底。

建议：纯化柱的洗脱液体积为 50-200 $\mu$ l；若洗脱效果并不理想，建议在加入预热的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 后，延长室温放置的时间，例如放置 5-10min。

7. 纯化柱在 Buffer PRW2 洗涤之后有乙醇残留。

建议：如果在 Buffer PRW2 洗涤，空管离心 1min 后还有乙醇残留，可以将空管离心操作的时间增加至 2min，或将纯化柱置于室温 5min，以充分除去残留乙醇。

8. 试剂盒使用不正确。

建议：对于多酚多糖的植物样本，使用普通的试剂盒如 Plant Total RNA Isolation Kit 可能不能获得理想的 RNA 样品，我们建议您使用 Plant Total RNA Isolation Kit Plus，这是我们专门针对多酚多糖植物样本而研制的专门用于提取多酚多糖类植物样本 RNA 的试剂盒。

## OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值偏低

ddH<sub>2</sub>O 进行 RNA 洗脱，并用于分光光度计读数时会时 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值偏低。我们建议如果要得到相对正确的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值，使用 pH7.5 10mM Tris-HCl（而不是 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 洗脱 RNA），具体见第十四页的“RNA 浓度及纯化检测”。

## 纯化获得的 RNA 有降解

纯化得到的 RNA 的质量和样本的保存、RNase 污染、操作等因素有关。

### 常见原因分析：

#### 1. 组织样本采集后没有及时保存。

建议：组织样本在收集后若不及时使用，请立即低温保存于液氮中或经液氮速冻后立即转移至-70℃长期保存，或者将样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNeasy Lysis Buffer 溶液（动物样本）。提取 RNA 请尽量使用新近采取的组织样本。

#### 2. 组织样本反复冻融。

建议：组织样本保存时，最好剪成小段保存，使用时取出其中一部分即可，避免样本的反复冻融导致 RNA 的降解。

#### 3. 操作间有 RNase 引入或没有佩戴一次性手套、口罩等。

建议：RNA 提取实验最好在单独的 RNA 操作间进行，并在实验前清理好实验桌，实验时佩戴一次性手套、口罩，最大程度上避免 RNase 引入导致的 RNA 降解。

#### 4. 试剂在使用过程中被 RNase 污染。

建议：更换新的植物总 RNA 提取系列试剂盒进行相关实验。

#### 5. RNA 操作时所用的离心管、枪头等有 RNase 污染。

建议：确认 RNA 提取时所用到的离心管、枪头、移液器等都是 RNase-Free。

## RNA 中含有 DNA 污染

#### 1. 没有进行 DNA-Cleaning Column 进行裂解物的分离而只是用高速离心代替进行裂解物上清的分离。

建议：DNA-Cleaning Column 不仅是为了进行组织裂解物的分离，更为重要的是它能最大限度的除去上清液中的基因组 DNA。这一步骤（见操作步骤第 4 步）一定不能省略。

#### 2. 跳过了使用 Buffer PRW1 洗涤 RNA-only Column（见操作步骤第 8 步）。

建议：这一步骤对于除去残留的 DNA 以及杂质蛋白十分重要，一定不能省略，否则将会导致纯化得到的 RNA 中含有 DNA 污染和蛋白污染。

## 纯化获得的 RNA 影响下游实验

经纯化柱纯化的 RNA，如果盐离子、蛋白质含量过多会影响下游实验，比如：逆转录、Northern Blot 等。

### 1. 洗脱后的 RNA 有盐离子残留。

建议：确认 Buffer PRW2 中添加了正确体积的乙醇，并按操作说明的离心转速进行 2 次纯化柱洗涤（见操作步骤第 10 步）；如果还有盐离子残留，可在纯化柱加入 Buffer PRW2 后，室温放置 5min，再进行离心操作，以最大程度上去除盐离子污染。

### 2. 洗脱后的 RNA 有乙醇残留。

建议：确认 Buffer PRW2 洗涤后，按操作说明的离心转速进行空管离心操作（见操作步骤第 12 步）；如果还有乙醇残留，可以将空管离心操作的时间增加至 2min，或者在空管离心后在室温放置 5min，以最大程度上去除乙醇残留。

中国·福际      World's Foregene

成都福际生物技术有限公司  
电话: 028-83360257, 028-83361257  
传真: 028-83361257  
E-mail: [info@foregene.com](mailto:info@foregene.com)  
[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

