

DiSpin 多糖多酚植物 RNA 快速提取试剂盒

货号：DP230-01

规格：50 次

保存：15-25℃

【产品简介】

本产品无需使用苯酚和氯仿快速提取植物样本 RNA，试剂盒中所配备的基因组 DNA 清除柱可以有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化，可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液能够迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，离心沉淀更有效的去除多糖多酚和次级代谢产物，基因组 DNA 清除柱有效吸附并清除残留 DNA。过柱得到的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，通过漂洗和离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，在低盐 RNase free H₂O 的洗脱下得到纯净的 RNA。

【产品组分】

货号	组分	体积
DP230-101	裂解液 CLB	50 ml
DP230-102	裂解液 RLT Plus	25 ml
DP230-103	去蛋白液 RW1	40 ml
DP230-104	漂洗液 RW（首次使用前加入 42ml 无水乙醇）	10 ml
DP230-105	RNase-free Water	10 ml
DP230-106	吸附柱 RA 和收集管（RNase-free）	50 套
DP230-107	基因组 DNA 清除柱和收集管	50 套

【保存条件】

室温保存，保质期一年。

【产品特点】

1. 不需要使用苯酚，氯仿等试剂，也无需乙醇沉淀。
2. 快速，简捷，单个样品操作 25 分钟内完成。
3. 独有的基因组 DNA 清除柱确保有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值达 2.1-2.2，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 等实验。

【注意事项】

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm 的离心机。
2. 需要自备乙醇。
3. 样品处理量不能超过基因组 DNA 吸附柱和 RNA 吸附柱处理范围，否则会造成 DNA 残留或者产量降低。在不清楚样品 DNA/RNA 含量时建议先使用较少的样品处理量，后面根据具体试验情况增加或者减少处理量。
4. 裂解液 CLB、RLT Plus 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，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，用清水或者生理盐水冲洗。

5. 关于 DNA 的微量残留:

特殊情况如 DNA 含量过于丰富造成残留或者要进行严格的 mRNA 表达量分析荧光定量 PCR, 建议在进行模板和引物的选择时:

- 1) 选用跨内含子的引物,以穿过 mRNA 中的连接区,这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
- 2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
- 3) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理以提高效果。
- 4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前, 直接在吸附柱上进行 DNase I 处理。

【使用方法】

提示:

第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量无水乙醇。

取 1ml 裂解液 CLB 至离心管内(如果 CLB 有析出或者沉淀需先置于 65°C 水浴重新溶解), 然后加入 50 μ l β -巯基乙醇。颠倒混匀后 65°C 水浴中预热。多个样品按照比例放大准备。

1. 直接研磨法(提取简单植物样品推荐此法, 也可以用液氮研磨法):

a. 称重取植物样品 100mg-200mg (水分少的样品如叶片、种子等可加 100mg-150mg, 水分多的样品如草莓、西瓜果肉可多加一些) 迅速剪成小块放入研钵, 加入 1ml 含有 β -巯基乙醇的 CLB, 室温下充分研磨成匀浆, 迅速研磨让组织和裂解液 CLB 充分接触以抑制 RNA 酶活性。

β -巯基乙醇是裂解液 CLB 的关键成分, 必要的时候可以提终浓度到 10-20%。

如果特别复杂植物, 可以尝试在裂解液中加入 PVP40 至终浓度 2%。

b. 将裂解物转入离心管, 立即剧烈振荡 15 秒, 放回 65°C 水浴中 (5-10 min), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。13, 000rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。

c. 取裂解物上清(在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

若上清表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面液体即可。

d. 迅速将混合物(每次小于 720 μ l, 多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱中, (清除柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。

2. 液氮研磨法(适用广泛, 提取复杂难破碎, 易降解样品时推荐此法):

a. 在液氮中将样品研磨至细粉。

b. 将 100mg-200mg 细粉加入到预热的含有 β -巯基乙醇的 CLB 离心管中。立即涡旋 30-60 秒或者用吸头吹打混匀裂解直得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。

c. 放回 65°C 水浴中 (5-10 min), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。

d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。

e. 取裂解物上清(在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

若上清表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面液体即可。

f. 迅速将混合物(每次小于 720 μ l, 多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱中, (清除柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。

3. 将基因组 DNA 清除柱子放入 2ml 离心管内，在基因组清除柱内加 500 μ l 裂解液 RLT Plus，13,000 rpm 离心 30 秒，收集滤液（RNA 在滤液中），用微量移液器较精确估计滤过液体积（通常为 450-500 μ l 左右，滤过时候损失体积应该减去），加入 0.5 倍体积的无水乙醇，此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程,立即吹打混匀,不要离心。
4. 立刻将混合物(每次小于 720 μ l，可分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 2 分钟，弃掉废液。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。
5. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
6. 加入 500 μ l 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW，重复一遍。
7. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
8. 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 30-50 μ l RNase free water(事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高产量)，室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。
9. 如果预期 RNA 产量>30 μ g，加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 8，合并两次洗液，或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高,分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%,但是浓度要低,用户根据需要选择。

附录 1: DNA 酶柱上消化

1. 按照前面所列 DP230-01 试剂盒操作步骤进行，直到完成步骤 4。
2. 取 45 μ l DNase I buffer 和 5 μ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液（处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液）。
3. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
4. 向吸附柱 RA 中央加入 50 μ l 的 DNase I 工作液，室温（20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C）放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上向膜四周浸润充分和膜接触，不要让工作液滴在 O 型垫圈或是离心柱管壁上挂壁或者挂在垫圈上不能充分和膜接触。
5. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1，12,000 rpm 离心 30-60 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. 接着做操作步骤 6，并完成后续所有步骤。

附录 2: RNA 含量少样品或者 RNA 复杂产量低的解决方案

可以提高样品处理量到 300-500mg/2ml 裂解液 CLB，上清过两根基因组 DNA 清除柱子，洗脱下来的 RNA 两个合并到一根 RNA 吸附柱上，可以大大提高 RNA 浓度。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。