

DiSpin 植物 Micro RNA 快速提取试剂盒

货号: DP223-01

规格: 50 次

保存: 15-25°C

【产品简介】

本产品无需使用苯酚和氯仿等试剂, 采用了独有的创新技术, 解决了长期以来用传统方法提取 microRNA 困难的问题。可以快速提取大多数复杂植物的 microRNA, 例如棉花、杨树、冬青、月季、丹参等。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。独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 植物 RNA 助提剂 PLANT Di 帮助结合多糖多酚并通过离心去除, 然后裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱, 基因组 DNA 被清除而 RNA (包括 microRNA) 被选择性滤过。滤过的 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
DP223-101	裂解液 RLT Plus	50 ml
DP223-102	PLANT Di	5 ml
DP223-103	Wash Buffer I (首次使用前加入 28ml 无水乙醇)	12 ml
DP223-104	Wash Buffer II (首次使用前加入 42ml 无水乙醇)	10 ml
DP223-105	RNase-free Water	10 ml
DP223-106	吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	50 套
DP223-107	基因组 DNA 清除柱和收集管	50 套

【保存条件】

室温保存, 有效期 18 个月。

【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 30 分钟内完成。
3. 独有的植物 RNA 助提剂可以有效结合多糖多酚, 提高清除效果。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值达 2.0-2.2, 可用于 RT-PCR, Northern-blot 等实验。
5. 适用于快速提取植物 microRNA 或者 microRNA/总 RNA 分别提取。

【注意事项】

1. 所有的离心步骤均可以在室温完成 (4°C 也无影响), 使用转速可以达到 13,000 rpm 的离心机。
2. 需要自备乙醇、β-巯基乙醇, 研钵(可选)。
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 RLT Plus 和 Wash Buffer I 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:

一般说来总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留 (包括用 DNase 消化), 本产品采用了独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术, 绝大多数 DNA 已经被清除, 个别特殊情况需要清除微量基因组 DNA 残留, 可使用以下两种 DNA 酶消化的方式。:

- 1) 传统DNA酶消化提取的RNA/microRNA, 热灭活DNA酶后直接用于后续实验。
 - 2) 传统DNA酶消化提取的RNA/microRNA, 然后使用RNA清洁纯化试剂盒 (CAT: DP117-01, **注意: 需要将操作步骤改动一个地方, 第二步加入250μl无水乙醇改成加入700μl无水乙醇**)清洁纯化后用于后续实验。
6. 如果遇到特别复杂多糖多酚, 淀粉等次级代谢产物特别丰富的样品, 如葡萄果实、水稻种子, 裂解液RLT Plus效果不佳的情况下, 可以使用本公司专用裂解液CLB。

【操作步骤】

提示:

首次使用前请先在 Wash Buffer I 和 Wash Buffer II 瓶中加入指定量无水乙醇。

对于 RNA 酶或者多酚特别丰富植物组织: 操作前在裂解液 RLT Plus 中加入β-巯基乙醇至终浓度 1%, 如 1 ml RLT Plus 中加入 10μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT Plus 4℃可放置一个月。

1. 直接研磨法 (提取简单植物样品推荐此法, 简单样品也可以用液氮研磨法):

- a. 新鲜植物组织称重后取 100mg-200mg 迅速剪成小块放入研钵 (冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 100mg-200mg 放入研钵), 加入 10 体积 (1ml) RLT 和 1 体积 (100μl) PLANT Di 室温下充分研磨成匀浆, 注意应该迅速研磨让组织和裂解液 RLT 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

注: PLANT Di 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富的困难样品不可缺少成分。

- b. 将裂解物转入离心管, 剧烈摇晃振荡 15 秒, 13,000rpm 离心 5-10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANT Di。
- c. 取 480μl 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) 将裂解物上清加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内)。
- d. 立刻接操作步骤的步骤 3。

2. 液氮研磨法 (提取复杂, 易降解样品时推荐此法):

- a. 取 500μl 裂解液 RLT, 转入 1.5ml 离心管中, 加入 50μl PLANT Di 混匀备用。
- b. 研磨适量植物组织成细粉后, 取 50mg-100mg 样品加入装有 RLT 和 PLANT Di 的离心管, 立刻手动剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。
- c. 用吸头吹打混匀裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。
- d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 5-10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANT Di。
- 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) 将裂解物上清加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内)。。
- f. 立刻接操作步骤的步骤 3。

注意: 以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理, 可以提高产量。也就是使用 1ml 的裂解液 RLT Plus 和 100μl PLANT Di 和 100mg-200mg 的样品。

3. 立即 13,000 rpm 离心 60 秒, 收集滤液 (RNA 在滤液中)。
4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (480μl 左右, 滤过时候损失体积应该减去), 加入 1.25 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。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。
5. 将混合物(每次小于 700μl, 多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 30 秒, 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。

6. 加 700 μ l Wash Buffer I (请检查是否已加入无水乙醇)，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
7. 加入 500 μ l Wash Buffer II (请检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500 μ l Wash Buffer II，重复一遍。
8. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 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。
9. 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，室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

将洗脱液加回到吸附柱重复洗脱步骤一遍可以提高产量约 10-15%。

10. 得到的 RNA/microRNA 可以立即用于下游反应或者尽快置于低温保存。

附录 1: microRNA 相对富集方法 (microRNA/去除了 microRNA 的总 RNA 分别提取)

提示:

- ⇒ 第一次使用前请先在指定瓶中加入指定量无水乙醇!
- ⇒ 对于 RNA 酶或者多酚特别丰富植物组织: 操作前在裂解液 RLT Plus 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml RLT Plus 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT Plus 4 $^{\circ}$ C 可放置一个月。

1. 直接研磨法 (提取简单植物样品推荐此法，但是简单样品也可以用液氮研磨法):

- a. 新鲜植物组织称重后取 100mg-200mg 迅速剪成小块放入研钵 (冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 100mg-200mg 放入研钵)，加入 10 体积 (1ml) RLT Plus 和 1 体积 (100 μ l) PLANT Di 室温下充分研磨成匀浆，注意应该迅速研磨让组织和裂解液 RLT 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

注: PLANT Di 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富的困难样品不可缺少成分。

- b. 将裂解物转入离心管，剧烈摇晃振荡 15 秒，13,000rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANT Di。
- c. 取 480 μ l 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，如残留基因组 DNA 较多，可适当减少取上清量) 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。
- d. 立刻接富集方法的步骤 3。

2. 液氮研磨法 (提取复杂，易降解样品时推荐此法):

- a. 取 500 μ l 裂解液 RLT Plus，转入 1.5ml 离心管中，加 50 μ l PLANT Di 混匀备用。
- b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后，取 50mg-100mg 细粉转入上述装有 RLT Plus 和 PLANT Di 的离心管，立即用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。
- c. 用吸头吹打帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果 (或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANT Di。
- 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。
- f. 立刻接富集方法的步骤 3。

注意: 以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理，可以提高产量。也就是使用 1ml 的裂解液 RLT Plus 和 100 μ l PLANT Di 和 100mg-200mg 的样品。

3. 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，保留滤液 (microRNA 在滤液中)。

此时，滤过液含有 microRNA，基因组 DNA 清除柱子上面是去除了 microRNA 的总 RNA（不包含 microRNA），如果需要，可以按照前面标准操作步骤 6—10 操作漂洗，洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积，加入等体积无水乙醇（必须是室温的），涡旋或者吹打充分混匀，不要离心。
5. 立刻将混合物(每次小于 700 μ l，多可以分两次加入)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。

6. 按照前面标准操作步骤 6—10 操作漂洗，洗脱得到富集的 microRNA。

注意：不同的实验可以选择不同的方法，例如Northern Blot或者表达芯片谱分析可以选择提取包括microRNA的总RNA。相对富集方法提取的microRNA因为去除了较大片段的mRNA和rRNA等，可能减少某些下游试验的扩增背景，当背景较高或者非特异扩增较多时，可以尝试使用相对富集方法提取的microRNA。

附录 2：本试剂盒使用裂解液 CLB 操作步骤

- ⇒ 第一次使用前请先在 Wash Buffer I 和 Wash Buffer II 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 $^{\circ}$ C 水浴重新溶解)，在裂解液 CLB 中加入 5% β -巯基乙醇（1ml CLB 加 50 μ l β -巯基乙醇），颠倒混匀后 65 $^{\circ}$ C 水浴中预热。

1. 液氮中研磨新鲜或-70 $^{\circ}$ C 冷冻的材料至细粉。
2. 转移 100mg-200mg 细粉（水分少的样品如种子叶片等可加 100mg-150mg，水分多的样品如西瓜可多加一些）加至预热的裂解液 CLB（已加有 β -巯基乙醇）离心管中，立即激烈涡旋 30—60 秒或者用吸头吹打混匀裂解，短时放回 65 $^{\circ}$ C 水浴中（5-10 min，时间稍长一点 10 分钟产量可能提高一些），中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。

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%。

3. 振荡混匀后室温 13,000rpm 离心 10 分钟。
4. 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。若上清表面有漂浮物，用吸头挑开吸取下面液体即可。

立刻接后续操作步骤。

【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。