

Flying Shark™ Universal Plant RNA Kit (DNase I)
广谱型植物 RNA 提取试剂盒 (DNase I)**目录号**

RNE35 (50 preps)

试剂盒组成

Component	RNE35 (50 preps)
DNase I	1 ml (1000 U)
10× Reaction Buffer	1 ml
Buffer HL	45 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
RNase-free H ₂ O	10 ml
Filter Columns CS with Collection Tubes	50
Spin Columns RA with Collection Tubes	50

保存方法

DNase I 及 10×Reaction Buffer -20°C 保存，其它组分室温（15-30°C）。



本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品介绍

本试剂盒配备强力裂解液 HL，适用性非常广泛，可以从多种植物组织（包括多糖多酚植物）中成功提取高质量 RNA，也适用于真菌、一些细菌和一些酵母的 RNA 提取。

独特的裂解液配方，迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，有效去除多糖多酚对 RNA 提取的影响，无需苯酚、氯仿等试剂。采用过滤柱（Filter Columns CS）套件去除裂解上清液中残留的组织碎片，进一步提高纯度；硅基质吸附膜（Spin Columns RA）对 RNA 进行吸附纯化，同时**高品质 DNase I 直接在柱上消化残留的 DNA**，使得提取的总 RNA 纯度高，无 DNA、蛋白质和其它杂质的污染，可直接用于 Real Time RT-PCR、RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译和分子克隆等多种下游实验。

RNA 得率

植物叶片（100 mg）	总 RNA 量（ μg ）
小麦	~55
枸杞	~65
拟南芥	~50
连翘	~60

自备试剂

β -巯基乙醇、无水乙醇

实验前准备及重要注意事项

1. 使用 RNase-free 的离心管和吸头；避开经常使用 RNase 的区域，以免 RNase 气溶胶污染。
2. 提取的样品避免反复冻融，否则影响 RNA 提取得率和质量。
3. 低温时如果 Buffer HL 产生沉淀，请水浴加热使其溶解后使用。
4. **Buffer HL 在使用前请加入 β -巯基乙醇至终浓度 2%，如 600 μl Buffer HL 加 12 μl β -巯基乙醇，最好现用现配。加入 β -巯基乙醇的 Buffer HL 室温可保存 1 个月。**
5. 第一次使用 Buffer RW2 前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。
6. 液氮研磨后，植物细胞被破坏，内源性 RNase 被释放出来，若此时失去低温的保护，RNA 容易被内源性 RNase 降解，因此**建议研磨样品前先准备好 Buffer HL，再进行研磨，并将研磨好的粉末迅速转入 Buffer HL 中混匀**，RNA 在 Buffer HL 中不会降解（具体方法见操作说明第 1-2 步）。

操作步骤 (以下所有离心步骤均在室温下进行)

1. 取 600 μ l Buffer HL (使用前请确认是否已加入 β -巯基乙醇) 至 1.5 ml 离心管中备用。
2. **匀浆处理**: 50-100 mg 植物组织在液氮中迅速研磨成粉末, 立即转入装有 Buffer HL 的离心管, 剧烈振荡混匀, 彻底匀浆, 不要有聚集成团的组织块。
注意: 1) 对于果肉类等含水量极其丰富的材料, 可以适当多加入些组织, 最多可增加至 200 mg; 对于富含淀粉的样本或成熟叶片, 可适当增加 Buffer HL 的用量, 最多可增加至 800 μ l。
2) 由于植物多样性非常丰富, 而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的 RNA 含量都不相同, 请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。
3. 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 2 min。
4. 将上清液转入已装入收集管的过滤柱 (Filter Columns CS) 中, 12,000 rpm 离心 1 min, 保留收集管中的上清液。
5. 缓慢加入 0.5 倍上清液体积的无水乙醇, 反复吸打混匀 (此时可能会出现沉淀), 将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns RA) 中, 若一次不能将全部溶液加入吸附柱中, 请分两次转入。12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
6. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l Buffer RW1, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
7. 配制 DNase I 混合液: 取 52 μ l RNase-Free H₂O, 向其中加入 8 μ l 10 \times Reaction Buffer 和 20 μ l DNase I (1 U/ μ l), 轻柔混匀, 配制成终体积为 80 μ l 的混合液。处理多个样品可按比例放大配制混合液。
8. 向吸附柱中直接加入 80 μ l DNase I 混合液, 室温 (20-30 $^{\circ}$ C) 放置 15 min。
9. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l Buffer RW1, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
10. 向吸附柱 RA 中加入 600 μ l Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
11. 重复步骤 10。
12. 将吸附柱放回空收集管内, 12,000 rpm 离心 2 min。
注意: 这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇, 乙醇残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。
13. 将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 30-50 μ l RNase-Free H₂O, 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 得到 RNA 溶液, -70 $^{\circ}$ C 保存, 防止降解。
注意: RNase-Free H₂O 体积不应少于 30 μ l, 体积过小影响回收效率。如果要提高 RNA 的产量, 可用 30-50 μ l 新的 RNase-Free H₂O 重复步骤 13; 如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 13。