

版本号:141110

EASYspin Plus Plant RNA Kit

EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒

目录号: RN38

❖ 适用范围:

适用于快速提取植物组织细胞总RNA, 使用独有基因组DNA清除柱技术可有效清除电泳可见gDNA残留, RNA可用于反转录PCR, 荧光定量PCR等。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	20 次(RN3801)	50 次(RN3802)
裂解液 RLT	室温	20 ml	50 ml
裂解液 CLB	室温	8 ml	8 ml
裂解液 RLT Plus	室温	10 ml	25 ml
去蛋白液 RW1	室温	15 ml	40 ml
漂洗液 RW	室温	5 ml	10 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	10 ml
PLANTaid	室温	2 ml	5 ml
基因组 DNA 清除柱 和收集管	室温	20 套	50 套
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	20 套	50 套

本试剂盒在室温储存 6 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 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。
2. 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。

❖ 产品介绍:

本公司独家推出 EASYspin 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上,又独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 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 PLANTaid 帮助结合多糖多酚并通过离心去除,然后裂解混合物用乙醇调节 RNA 结合吸附到基因组 DNA 清除柱,然后 RNA 被选择性洗脱滤过, 吸附在基因组 DNA 清除柱上的残留 DNA 无法洗脱连同柱子一起丢弃从而清除掉 DNA。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,再通过一系列快速的漂洗—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,最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ 产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚,氯仿等试剂,也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 简捷,单个样品操作一般可在 25 分钟内完成,世界上最简单快速的试剂盒。
3. 独有的植物 RNA 助提剂 PlantAid 可以有效结合多糖多酚,提高清除效果。
4. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 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。
5. 世界领先适应性极其广泛,可以提取包括棉花、松针、水稻种子、葡萄果实、等 100 多种国内外试剂盒提取失败的样品。详细样品列表请参考公司主页产品介绍。
6. 多次柱漂洗确保高纯度,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.9~2.2,基本无 DNA 残留,可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

❖ 注意事项

1. 所有的离心步骤均可在室温完成(4℃离心也可以),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。
2. 需要自备乙醇,研钵(可选)。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱DA和和RNA吸附柱RA处理能力,否则造成DNA残留或产量降低。开始摸索实验条件时,如果不清楚样品DNA/RNA含量时可使用较少的样品处理量,将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
4. 裂解液RLT和RLT Plus 和去蛋白液RW1中含有刺激性化合物,操作时戴乳胶手套,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。

5. 关于DNA 的微量残留:

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留 (DNase 消化也无法做到 100%无残留), 本公司的 EASYspin Plus RNA 提取产品, 由于采取了本公司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, 不需要 DNase 消化, 可直接用于反转录 PCR 和荧光定量 PCR。个别特殊情况如 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, 我们建议在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。本试剂盒还可以用于DNase I处理后的RNA清洁(cleanup), 请联系我们索取具体操作说明书。
 - 4) 在步骤去蛋白液RW1漂洗前, 直接在吸附柱RA上进行DNase I柱上消化处理。购买DNA酶柱上消化试剂盒(货号: RN34)前可先索取具体操作说明书。
6. 仔细阅读补充说明2, 如果裂解液CLB效果好, 可以联系我们单独订购裂解液CLB, 或者购买试剂盒的时候, 指明将裂解液RLT换成裂解液CLB。

❖ 操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

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!

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 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 放入研钵), 加入 **10 体积 (1ml) RLT 和 1 体积 (100μl) PLANTaid 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: PLANTaid 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 PLANTaid。

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) 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**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 500 μ l 裂解液 RLT, 转入 1.5ml 离心管中, 加入 50 μ l PLANTaid 混匀备用。

b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后, 取 50mg 细粉转入上述装有 RLT 和 PLANTaid 的离心管, 立即用手剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。

c. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果(或者手动匀浆 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 PLANTaid。

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**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 和 100 μ l PLANTaid 和 100mg 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, 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。

4. 将基因组 DNA 清除柱子放在一个干净 2ml 离心管内(不用 RNase free 或者 DEPC 处理, 一般干净的新离心管即可。也可使用 RNA 吸附柱配套的新的干净收集管), 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。

5. 立刻将混合物(每次小于 720 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. 加 700μl 去蛋白液 RW1, 室温放置 1 分钟, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
7. 加入 500μl 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 500μl 漂洗液 RW, 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 30-50μl RNase free water (事先在 70-90℃ 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。
10. 如果预期 RNA 产量>30μg, 加 30-50μl RNase free water 重复步骤 9, 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。

补充说明 1: 一般植物种类非常复杂, 不同的植物种类和部位的样品使用本试剂盒 (RN38 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒) 效果不同。部分的样品在经过基因组 DNA 清除柱清除残留 DNA 的同时可能会严重降低产量。该种情况下, 建议客户可以尝试按照 RN09 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒的操作步骤进行提取。略去基因组 DNA 清除柱的步骤。RN09 和 RN38 相比少一个基因组 DNA 清除柱的步骤, 部分情况下可能会提高产量。如果 RN09 提高产量的同时 DNA 残留也增多的情况下, 客户可以根据实验需要加一个 DNA 酶柱上消化的步骤 (货号: RN34) 来清除残留 DNA 或者用传统的 DNA 酶消化来清除 DNA 残留。

附录 1: RN09 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒操作步骤

RN09 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒和 RN38 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒的操作完全相同, 就是省略了步骤 3 和 4, 在步骤 1 和 2 后直接接步骤 5。也可以找我们索取 RN09 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒详细说明书或者公司的主页下载 www.aidlab.cn

补充说明 2：有一些特别复杂的样品使用裂解液 RLT 提取失败或者产量很低想提高产量的情况下，可以尝试使用裂解液 CLB，裂解液 CLB 是本公司最新研发配方，测试的松针、丹参叶、胡杨叶、番茄叶表明可以提高产量一倍甚至数倍。

附录 2：RN38 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒使用新裂解液 CLB 操作步骤

⇒ 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)，在裂解液 CLB 中加入 5%β-巯基乙醇（1ml CLB 加 50μl β-巯基乙醇）。颠倒混匀后 65° C 水浴中预热。

1. 液氮中研磨新鲜或-70° C 冷冻的材料至细粉。
2. 转移 100-150mg 细粉（水分少的样品如种子叶片等可加 100mg，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° C 水浴中（5 min），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，必要的时候可以提高终浓度到 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。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。

5. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

附录 3：使用 RN38 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒和 RN09 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒发表的部分文章 60 篇：

1. 桃果实、花、根、叶：Isolation, characterisation and phylogenetic analysis of resistance gene analogues in a wild species of peach (*Prunus kansuensis*). Canadian Journal of Plant Science, 2011, 91(6): 961-970
2. 櫻桃花、叶、萼等各部位：Over-expression of the PaAP1 gene from sweet cherry (*Prunus avium* L.) causes early floweri. Journal of Plant Physiology, 2012, Available online 1 December 2012
3. 洋葱根、茎、蕾、叶、雌雄蕊等各部位：Cloning and Expression Analysis of A Putative B Class MADS-box Gene of AcPI in Onion. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(23):4759-4769
4. 芜菁：Isolation and Functional Characterisation of the Genes Encoding Δ8-Sphingolipid Desaturase from *Brassica rapa*. Journal of Genetics and Genomics Volume 39, Issue 1, January 2012, Pages 47–59

5. 芜菁 1 : EXPRESSION, DIVERGENCE AND EVOLUTION OF THE CALEOSIN GENE FAMILY IN BRASSICA RAPA. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 65 (3), 863-876, 2013
DOI:10.2298/ABS1303863H
6. 番茄叶: Effect of Low Temperature Stress on the Expression of ProDH Gene and the Activities of the Proline Dehydrogenase in Leaves of Tomato Seedling. Chinese Agricultural Science Bulletin 2012,28(10):132-135
7. 梔子叶: Isolation of High Quality Total RNA from Gardenia jasminoides Eills.Chinese Agricultural Science Bulletin.2012, 28(27):194-198
8. 油桐果实: Cui Qinqin, Han Xiaojiao, Chen Yicun, Zhan Zhiyong, Lin Liyuan, Wang Yangdong. Isolation and Expression Characteristics of Biotin Carboxyl Carrier Protein Coding Gene (VFBCCP) from Vernicia fordii.SCIENTIA SILVAE SINICAE. 2012, 48(8): Available online August
9. 油桐果实 1: Selection of Reliable Reference Genes for Gene Expression Studies Using Real-Time PCR in Tung Tree during Seed Development. PLoS ONE, 2012, 7(8): e43084
10. 紫菜: Molecular cloning and expression analysis of ribosomal protein S7 gene from Porphyra haitanensis. JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA, 2011, 35 (12): 1814-1821
11. 石斛: Molecular characterization of a mitogen-activated protein kinase gene DoMPK1 in Dendrobium officinale. Acta Pharmaceutica Sinica, 2012, 47 (12): 1703-1709
12. 石斛 1: ESTs Analysis Reveals Putative Genes Involved in Symbiotic Seed Germination in Dendrobium officinale. Symbiotic Germination Genes in D. officinale. August 2013 | Volume 8 | Issue 8 | e72705
13. 大豆: RNA-seq Analysis Reveals Ethylene-Mediated Reproductive Organ Development and Abscission in Soybean(Glycine max L. Merr.). Plant Mol Biol Rep, 2012, published online: 4 Dec, 2012
14. 大豆 1: Construction of ethylene regulatory network based on the phytohormones related gene transcriptome profiling and prediction of transcription factor activities in soybean. Acta Physiol Plant, 2012, published online: 12 Dec, 2012
15. 红花玉兰: Expression Analysis of MAwuAG in Different Organs and Developmental Stages of Magnolia wufengensis. Chinese Bulletin of Botany, 2013, 48 (2): 1-5
16. 毛桃: Cloning and Phylogeny Analysis of PpAP2 Floral Homologous Genes in Peach. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(7): 99-104
17. 五倍子: Cloning and characterisation of a phenylalanine ammonia-lyase gene from Rhus chinensis. Plant Cell Rep, 2013, published online: 15 March, 2013
18. :五倍子 1: Cloning, characterization and expression of chalcone synthase from medicinal plant Rhus chinensis.J. Plant Biochem. Biotechnol. DOI 10.1007/s13562-013-0231-9
19. 青杆: cDNA Cloning and Bioinformatic Analysis of the sPPa1 Gene form Picea wilsonii. Plant Science Journal, 2012, 30(40): 394-401
20. 青杆 1: cDNA Cloning and Bioinformatic Analysis of PsbO Gene from Picea wilsonii.Life Science Research, 2012, 16(3): 201-206
21. 青杆 2: Cloning and Tissue Expression Analysis of PwPSAF in Picea wilsonii. SCIENTIA SILVAE SINICAE. Vol. 49, No. 10, Oct. 2013.
22. 洋葱: Molecular Cloning and Transcriptional Analysis of the Putative AGAMOUS Homolog AcAG in Onion (Allium cepa. Plant Mol Biol Rep, DOI 10.1007/s11105-013-0607-y

23. 木瓜: XsFAD2 gene encodes the enzyme responsible for the high linoleic acid content in oil accumulated in *Xanthoceras sorbifolia* seeds. JOURNAL ARTICLE. 2013-6-17.
24. 木瓜 1: Two novel diacylglycerol acyltransferase genes from *Xanthoceras 2 sorbifolia* are responsible for its seed oil content. GENE-38688; No. of pages: 9; 4C:
25. 柑橘: Efficient auto-excision of a selectable marker gene from transgenic citrus by combining the Cre/loxP system and ipt selection. Plant Cell Rep, DOI 10.1007/s00299-013-1470-x
26. 柑橘 1: Expression Analysis of Three Phloem-specific Promoters in Transgenic *Poncirus trifoliata*. Acta Horticulturae Sinica. 2014, 41(1): 1–8.
27. 柑橘 2: Activation of three pathogen-inducible promoters in transgenic citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) after *Xanthomonas axonopodis* pv. citri infection and wounding. Plant Cell Tiss Organ Cult. DOI 10.1007/s11240-013-0423-y.
28. 茶梅花瓣: Comparison and Analysis of Methods of Extracting Total RNA from Petals of *Camellia sasanqua*. Chinese Agricultural Science Bulletin. 2013, 29(28):129-133.
29. 栀子: Isolation of High Quality Total RNA from *Gardenia jasminoides* Eills. Chinese Agricultural Science Bulletin. 2012, 28(27):194-198
30. 丹参: Genome-wide analysis and molecular dissection of the SPL gene family in *Salvia miltiorrhiza*. 2014 Jan;56(1):38-50. doi: 10.1111/jipb.12111. Epub 2013 Nov 20.
31. 牡丹: Transcriptome Comparison Reveals Key Candidate Genes Responsible for the Unusual Reblooming Trait in Tree Peonies. Genes Responsible for Reblooming in Tree Peonies. November 2013 | Volume 8 | Issue 11 | e79996
32. 东南景天: Role of sulfur assimilation pathway in cadmium hyperaccumulation by *Sedum alfredii* Hance. Ecotoxicology and Environmental Safety. Volume 100, February 2014, Pages 159–165.
33. 山苍子: Identification of appropriate reference genes for normalizing transcript expression by quantitative real time PCR in *Litsea cubeba*. TECHNICAL NOTE. Mol Genet Genomics (2013) 288:727–737, DOI 10.1007/s00438-013-0785-1
34. 木本植物: Heterologous gene silencing induced by tobacco rattle virus (TRV) is efficient for pursuing functional genomics studies in woody plants. ORIGINAL PAPER. Plant Cell Tiss Organ Cult, DOI 10.1007/s11240-013-0393-0
35. 棉花: Analysis of sea-island cotton and upland cotton in response to *Verticillium dahliae* infection by RNA sequencing. Sun et al. BMC Genomics 2013, 14:852 /1471-2164/14/852.
36. 桃子: Biochemical changes and defence responses during the development of peach gummosis caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Eur J Plant Pathol (2014) 138:195–207, DOI 10.1007/s10658-013-0322-4.
37. 桃子 1: Carbohydrate metabolism changes in *Prunus persica* gummosis infected with *Lasiodiplodia theobromae*. Phytopathology "First Look" paper • <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0025-R> • posted 11/27/2013.
38. 海棠: The *Malus crabapple* transcription factor McMYB10 regulates anthocyanin biosynthesis during petal coloration. Scientia Horticulturae 166 (2014) 42–49.
39. 海藻: A rapid and sensitive method for field detection of *Prorocentrum donghaiense* using reverse transcription-coupled loop-mediated isothermal amplification. Harmful Algae 29 (2013) 31–39. (篇幅有限, 以下仅列出植物种类名称, 发表文章全文可联系我们索取: 40 油茶, 41 亚洲百合, 42 毛泡桐, 43 人参, 44 雪莲, 45 柑橘 3, 46 菊花, 47 荞麦和拟南芥, 48 油松, 49 玫瑰花, 50 棉花和拟南芥, 51 棉花和拟南芥 1, 52 白杨, 53 毛果杨, 54 葛根, 55 百合, 56 百合 1, 57 黄鹌菜, 58 棉花 1, 59 苹果, 60 毛果杨)