

版本号:250306

PLANTpure Plant RNA Kit**PLANTpure 通用植物总 RNA 快速提取试剂盒**

目录号: RN33

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	50 次(RN3301)	100 次(RN3302)
TRIpure Reagent (4°C 避光)	50 ml	100 ml
去蛋白液 PE	16 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇	32 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇
漂洗液 RW	10 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇	25 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇
RNase-free H ₂ O	5 ml	10 ml
RNase-free 吸附柱 RA	50 个	100 个
收集管 (2 ml)	50 个	100 个

本试剂盒（除低温组分外）在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 运输和储存均在室温下（15°C-25°C）进行。TRIpure Reagent 可以常温运输，收到后 **4°C 避光可长期保存，常温保存 3 个月也不影响使用质量。**
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:

改进的异硫氰酸胍/酚一步法（TRIzol 法）裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后总 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 water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. TRIpure Reagent 对应 Thermofisher/Invitrogen 的 TRIzol(Thermofisher 货号：15596026)，可以有效的消除基因组污染。效果和进口一致。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
5. 有效的去除了 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。

❖ 注意事项

1. 本试剂盒抑制RNA酶效果极佳，所有离心步骤如未加说明，均可在常温进行。
2. TRIpure Reagent和去蛋白液PE中含有刺激性有害化合物，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，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
3. 考虑到环保问题，本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，使用前需要自备氯仿（或者购买艾德莱氯仿替代试剂，货号：RN66）。
4. 常规的琼脂糖凝胶电泳和甲酰胺变性胶电泳均可以用来分析RNA的质量。好的RNA产物在变性电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体RNA带，分别为~5 Kb（28S），~2 Kb（18S）（注意普通的琼脂糖电泳，28S和18S大约在2 Kb和1 Kb位置，而且可以随着RNA空间二级结构不同，电泳条带所在位置不是固定的），条带亮度比值约为2:1。有时候也可以看到~0.1 kb和0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到4, 5条带也属于正常现象，如果RNA未成熟的前体或者不均一核RNA、小核RNA提取出来也可能看到介于7 Kb和15 Kb之间的不连续的高分子量条带。
5. 检测OD₂₆₀/OD₂₈₀吸光度比值时，如需稀释RNA样品应该用TE（PH 8），如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和PH值低，会使OD₂₈₀升高，从而使比值降低。

6. 加入TRIpure匀浆后，加氯仿前，样品可在 -60°C 至 -70°C 保存一个月以上。
7. 本试剂盒用于TRIzol可以提取的植物样品，如果植物样品多糖多酚丰富导致提取效果不佳，应该选择艾德莱的EASYspin系列植物RNA提取试剂盒（目录号：RN38或者RN53等）。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

- ⇒ 第一次使用前按照漂洗液 RW 和去蛋白液 PE 瓶子标签指示加入无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入，以免多次加入！
1. 取1 ml裂解液TRIpure试剂，转入1.5 ml离心管中，备用。
 2. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后，取60-100 mg细粉转入上述装有TRIpure的离心管，立即用手剧烈振荡20 sec充分裂解（可以手动或者电动匀浆提高产量）。
 3. 将匀浆样品剧烈震荡混匀，在 $15-30^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育5 min以使核蛋白体完全分解。
 4. **可选步骤（一般不需要）：** 4°C 的条件下12, 000 rpm 离心10 min，小心取上清转入一个新的1.5 ml的离心管中。当样品富含多糖或是植物的块茎部分时可能需要这一额外的分离步骤。
 5. 每1ml TRIpure加0.2 ml氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡15 sec并将其在室温下孵育3 min。
▲如果氯仿无法获得，可以购买艾德莱的氯仿替代试剂（货号：RN66）
 6. 于 4°C 12, 000 rpm 离心10 min，样品会分成三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相，RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加TRIpure体积的50%，把水相小心转移到新管中（不要触碰中间层），记录水相体积。
 7. 加入水相体积一半也就是0.5倍体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱RA中（吸附柱套在收集管内，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱RA中，请分两次转入吸附柱RA中。），室温（以下步骤均为室温）12, 000 rpm 离心30 sec，弃废液，将吸附柱重新套回收集管。
 8. 加 500 μl 去蛋白液 PE **（请先检查是否已加入无水乙醇!）**，12, 000 rpm

离心 30 sec, 弃废液。

9. 加入500 μ l漂洗液RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12, 000 rpm 离心15 sec, 弃废液。
10. 重复步骤9一次。
11. 将吸附柱RA放回空收集管中, 12, 000 rpm离心2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
12. 将吸附柱RA转移至新的1.5 ml离心管中, 向吸附柱膜中央悬空滴加50-80 μ l的RNase-free ddH₂O, 静置2 min, 12, 000 rpm离心1 min。

▲洗脱体积建议不少于 30 μ l, 体积过小会影响核酸回收效率。

▲以下步骤都可以帮助提高 RNA 产物浓度:

RNase-free ddH₂O 于洗脱前先在 70-90°C 预热;
将第一次洗脱液重新加入吸附柱进行第二次洗脱。