



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-times.com.cn

E-mail: real-times@163.com

RealPure Plant RNA Extraction Kit

(for containing high polysaccharide and polyphenol components)

RealPure 多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒

● 试剂盒内容及保存:

试剂盒组成	RTR2304-01 (50 次)	贮存方式
裂解液 RL	30 ml	常温
缓冲液 PRS	3 ml	常温
裂解液 RL plus	30 ml	常温
去蛋白液 RD	30 ml	常温
	25 ml	
漂洗液 RW (浓缩液)	首次使用按照标签加入 无水乙醇	常温
RNase-free 水	5 ml	4℃
DNA 清除柱 CS (RNase-free)	50 个	常温
RNA 吸附柱 CR (RNase-free)	50 个	常温
收集管	100 个	常温
2 ml 离心管 (RNase-free)	50 个	常温
1.5 ml 离心管 (RNase-free)	150 个	常温
说明书	1 份	

● 储存条件和效期:

RNase-free 水 4℃ 保存; 其他试剂在常温 (25℃左右) 干燥条件下, 可保存 1 年。试剂盒常温运输。

● 产品简介:

本试剂盒可从植物叶片、茎、幼苗、果肉中快速提取总 RNA, 可同时处理大量不同样品。试剂盒配套缓冲液 PRS (Phenolic Remove Solution) 可以去除植物中的多糖多酚对 RNA 提取的影响。20-30 分钟内即可完成反应, 提取的总 RNA 纯度高, 没有 DNA 和蛋白的污染, 可用于 Northern blot、Dot blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等实验。

该试剂盒不能有效提取植物种子、块茎、鳞茎的 RNA, 提取这些材料的 RNA 请选择 RealPure 植物种子 RNA 提取试剂盒 (Cat: RTR2308)。

● 植物 RNA 提取介绍:

由于植物种类繁多, 不同的植物种类和部位的样品使用本试剂盒效果不同。我们已经测试成功的植物列表如下:

植物样品种类	提取植物材料	是否添加缓冲液 PRS	推荐裂解液	RNA 质量度		RNA 得量
				A260/280	A260/230	
简单植物叶片、 幼苗、茎	玉米叶片	-	裂解液 RL			30-40 µg/100 mg
	小麦叶片	-	裂解液 RL			40-50 µg/100 mg
	水稻叶片	-	裂解液 RL			45-55 µg/100 mg
	拟南芥叶片	-	裂解液 RL			10-15 µg/100 mg
	烟草叶片	-	裂解液 RL			40-55 µg/100 mg
	绿萝叶片	+/-	裂解液 RL			30-35 µg/100 mg
多糖多酚植物 叶片	银杏叶片	+	裂解液 RL			10-15 µg/50 mg
	松针	+	裂解液 RL			10-15 µg/50 mg
	毛白杨叶片	+	裂解液 RL			20-30 µg/50 mg
	冬青叶片	+	裂解液 RL			1-5 µg/50 mg
	法国梧桐样品	+	裂解液 RL	2.14	1.97	10-20 µg/50 mg
种子	黄豆种子	+	裂解液 RSL			40-50 µg/50 mg
	花生种子	+	裂解液 RSL			20-25 µg/50 mg
	玉米种子	+/-	裂解液 RSL	2.00	2.37	20-40 µg/50 mg
	水稻种子	+	裂解液 RSL			5-10 µg/50 mg
	小麦种子	+/-	裂解液 RSL	2.03	2.28	10-15 µg/50 mg
	高粱种子	+	裂解液 RSL			5-10 µg/50 mg
	绿豆种子	+	裂解液 RSL			5-10 µg/50 mg
	油莎豆	+	裂解液 RSL	2.26	2.17	7-15 µg/50mg
	拟南芥种子	+	裂解液 RSL	2.17	1.98	3-5µg/50mg
水果果肉	芒果	+	裂解液 RL			1-2 µg/50 mg
	西红柿	+	裂解液 RL			2-3 µg/50 mg
	苹果	+	裂解液 RL			3-5 µg/50 mg
	西瓜	+	裂解液 RL			1-2µg/50 mg
	香蕉	+	裂解液 RL			2-3 µg/50 mg
	梨	+	裂解液 RL			3-5 µg/50 mg
真菌材料	香菇菌丝体	-	裂解液 RL/RSL			2-3 µg/100 mg
	平菇菌丝体	-	裂解液 RL			2-3 µg/100 mg
块茎	马铃薯	+/-	裂解液 RSL			10-15 µg/50 mg
	紫薯	+/-	裂解液 RSL	2.35	1.91	2-5 µg/50 mg

注: + 表示添加, -表示不添加, +/- 表示添加不添加均可, NA 表示无数据

● 准备工作:

- 1 操作前在裂解液 RL 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 500 μ l RL 中加入 5 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RL 4 $^{\circ}$ C 可放置 3 天。
- 2 按照标签所示在漂洗液 RW 中加入无水乙醇（自备），混匀后盖紧瓶盖后室温贮存备用。
- 3 所有离心步骤均在常温下进行。

● 操作步骤:

1. 样品处理:

1.1 1.5 ml 离心管中加入 500 μ l 裂解液 RL（使用前请先检查是否已加入 β -巯基乙醇），50 μ l 缓冲液 PRS 混匀备用。

注：多糖多酚植物（如银杏，毛白杨等）加入 RL 后，要加入缓冲液 PRS，普通植物（如拟南芥，小麦，水稻，烟草）可以不加缓冲液 PRS。如果不能判断植物是否为多糖多酚植物，请加入缓冲液 PRS。

注：快速判断是否为多糖多酚植物:

取 20mg 左右的植物材料，放入 1.5 ml 离心管中，加入 0.5 ml 0.2 M NaOH 溶液，95 $^{\circ}$ C 10 分钟，观察裂解物颜色。颜色为绿色或淡黄色为普通植物；颜色为棕黄色或棕红色为多糖多酚植物。

1.2 将植物材料加入到液氮预冷的研钵中，用研杵研磨，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状。取 50 mg 粉末迅速加入到离心管中，涡旋剧烈震荡混匀，常温放置 5 分钟。

注：一定不要加入超过 50 mg 的粉末，否则样品超过裂解液 RL 的裂解能力会导致 RNA 提取失败。

2. 离心取上清:

13,000 rpm 离心 5 min，小心吸取收集管中的上清至 1.5 ml RNase-free 的离心管中，吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。一般可获得 400 μ l 上清。

3. 去除基因组污染:

上清中加入 0.5 倍体积的无水乙醇（如 400 μ l 上清中加入 200 μ l 无水乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入 DNA 清除柱 CS（清除柱放入收集管中）中，13,000 rpm 离心 2 分钟，弃掉收集管中的废液。

注：确保全部溶液都收集到收集管中，如果膜上有残留液体，延长离心时间至 5 分钟，保证膜上无残留液体。

4. 洗脱 RNA:

将 DNA 清除柱放入一干净的 2 ml 离心管中，在清除柱中加入 500 μ l 裂解液 RL plus，13,000 rpm 离心 1 分钟，收集滤液（**注意：RNA 在滤液中，不要丢弃**），滤液中加入 250 μ l 无水乙醇，此时可能会出现沉淀，立即混匀，不要离心。

5. RNA 挂柱:

将全部溶液加入到 RNA 吸附柱 CR 中（吸附柱放入收集管中），13,000 rpm 离心 2 分钟。

注：确保溶液全部过滤到收集管中，膜上无残留，如有必要，可以延长离心时间至 5 分钟。

6. 去除 RNA 中的蛋白污染:

向 RNA 吸附柱 CR 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μ l 去蛋白液 RD，13,000 rpm 离心 1 分钟，弃废液。

7. 去除 RNA 中的其他杂质:

向 RNA 吸附柱 CR 中加入 700 μ l 漂洗液 RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 13,000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液。

8. 进一步去除 RNA 中的其他杂质:

向吸附柱 CR 中加入 500 μ l 漂洗液 RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 13,000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液, 将吸附柱 CR 放回收集管中, 确保盖好吸附柱管盖。

9. 关键步骤: 彻底去除吸附柱上的残余乙醇:

13,000 rpm 将吸附柱 CR 空甩离心 2 分钟, 去除吸附柱上的残余液体。

注: 此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 如果有漂洗液残留, 可能会影响后续的 RT 等实验操作。

10. 洗脱得到 RNA:

将 RNA 吸附柱 CR 转入一个新的 1.5 ml RNase-free 离心管中, 向吸附柱 O 型垫圈中央悬空加入 50-100 μ l RNase-free 水 (事先 65 $^{\circ}$ C 预热可提高洗脱效率), 盖好吸附柱管盖, 常温放置 2 分钟, 13,000 rpm 离心 2 分钟。

注: 确保水要加到膜的中央, 不要贴壁加入; 洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ l, 体积过小影响回收效率。

11. RNA 贮存:

RNA 样品-80 $^{\circ}$ C 中保存。

● RNA 产量和质量的评估:

1. RNA 产量:

用分光光度计测定 OD₂₆₀ 的吸光值来计算 RNA 产量。将 RNA 按照一定的比例稀释于 TE 溶液 (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA) 中, 根据以下公式计算:

$$A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 = \mu\text{g RNA/ml}$$

注: 测定 OD 值时, 尽量不要用 RNase-free 水稀释 RNA, 因为 RNase-free 水 pH 较低, 测定的 OD 值偏低。

2. RNA 质量:

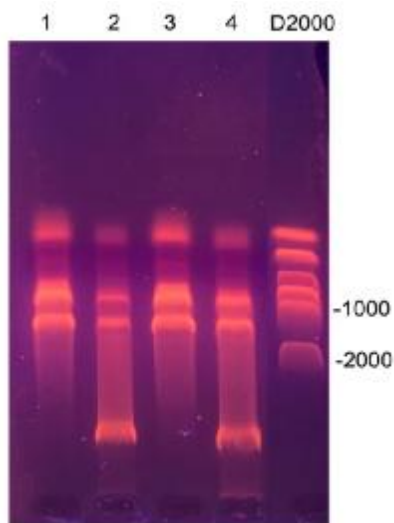
凝胶电泳检测: 凝胶电泳中, 完整的 RNA 应该有两条主带: 28S 和 18S, 并且 28S 亮度应该与 18S 相当或是其亮度的 2 倍。可以使用普通的 1 \times TAE 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶浓度 1-1.5 %, 可以使用高电压, 短时间电泳, 如 7V/cm 电泳, 20 分钟。建议使用 D2000 DNA ladder (Cat: RTM415) 作为 Marker。植物 28S rRNA 迁移率与 1500bp 类似, 18S rRNA 迁移率与 1000bp 类似。

吸光值检测: 可以用 A₂₃₀, A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 的数值表示 RNA 的纯度。纯净的 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值应该为 2, 我们得到的 RNA 样品比值应在 1.8-2.2 之间, 如果比值低于 1.8, 表明 RNA 样品中蛋白污染比较严重。A₂₆₀/A₂₃₀ 比值应该在 2-2.2 之间。如果此比值低于 2, 表明 RNA 样品中有胍盐, 多糖的污染。

植物RNA提取试剂盒操作示意图

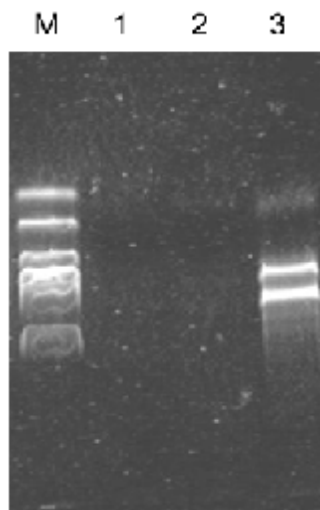


● 实验示例:



绿萝叶片 RNA

- 1, 3 使用了 DNA 清除柱
2, 4 未使用 DNA 清除柱
1% 琼脂糖凝胶 1×TAE 150V 20min



冬青叶片 RNA

- 1, 2 RL 中未加 PRS, 不能提取到 RNA
3 使用 PRS 和 DNA 清除柱后得到的 RNA
1% 琼脂糖凝胶 1×TAE 150V 20min

● 问题指南:

1. 离心柱发生堵塞

离心柱发生堵塞之后会造成 RNA 得率降低甚至不能纯化得到 RNA。

常见原因分析如下:

1.1: 样本破碎不彻底。

样本破碎不彻底会使吸附柱发生堵塞,同时会影响 RNA 得率及质量。我们建议在进行样本破碎的时候,在足量的液氮中快速研磨操作,尽量破碎样本细胞壁、细胞膜等组织。

1.2 样本初始量过多。

样本使用量过多会导致裂解液 RL 或裂解液 RSL 裂解细胞时不完全,导致离心柱堵塞。RealPure 多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒和 RealPure 植物种子 RNA 提取试剂盒处理样本的初始最大量为 50 mg。

1.3 离心机的温度过低。

整个 RNA 分离纯化除了液氮破碎样本组织外,所有的步骤均在常温(20-25℃)进行。有些低温离心机的温度低于 20℃,可能会造成离心柱的堵塞。如果发生这种现象,请将离心机温度设置到 20-25℃。

2. 提取不到 RNA 或者 RNA 产量低

通常会有多种因素影响回收效率,比如:样本 RNA 含量、操作方法、洗脱体积等。

常见原因分析:

2.1 样本保存不当或样本保存时间过久导致 RNA 已经降解。

建议:新采集的样本应立即放入液氮中速冻,长期保存于-70℃并避免样本的反复冻融;或者将

样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNAwait 溶液中。

2.2 样本破碎裂解不充分导致纯化柱堵塞。

建议：在组织研磨时，请保证组织充分研磨，并在研磨完成后迅速转移至预先准备好的裂解液 RL 或裂解液 RSL（确认已添加正确比例的 β -ME）中。

2.3 洗脱液添加不正确。

建议：确认 RNase-Free 水滴加到了纯化柱膜 O 型垫圈中央位置。

2.4 漂洗液 RW 中没有添加正确体积的无水乙醇。

建议：请按照说明书，在试剂盒使用前，漂洗液 RW 中添加正确体积的无水乙醇并混匀。

2.5 组织样本用量不合适。

建议：每 500 μ l 裂解液 RL 或裂解液 RSL 使用最大组织量 50 mg，组织使用过多会导致 RNA 提取量降低并且得到的 RNA 纯度也会降低。**我们强烈建议每单次 RNA 提取操作，样本初始用量一定不要超过最大建议量。**

2.6 洗脱体积不合适或洗脱不彻底。

建议：纯化柱的洗脱液体积为 50-100 μ l；若洗脱效果并不理想，建议在加入 65 $^{\circ}$ C 预热的 RNase-Free 水后，延长常温放置的时间，例如放置 5-10 min。

2.7 纯化柱在第二次 RW 洗涤之后有乙醇残留。

建议：漂洗液 RW 洗涤后，吸附柱空甩离心 2 min 是关键步骤，以充分除去吸附柱上残留的乙醇。

2.8 试剂盒使用不正确。

建议：对于多酚多糖的植物样本，务必使用缓冲液 PRS，这是我们专门针对多酚多糖植物样本而研制的多糖多酚去除剂，如不添加，将导致 RNA 不能挂柱或提取到纯度不高的 RNA。

3. 纯化获得的 RNA 有降解

纯化得到的 RNA 的质量和样本的保存、RNase 污染、操作等因素有关。

常见原因分析：

3.1 组织样本采集后没有及时保存。

建议：组织样本在收集后若不及时使用，请立即低温保存于液氮中或经液氮速冻后立即转移至-70 $^{\circ}$ C 长期保存，或者将样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNAwait 溶液中。提取 RNA 请尽量使用新近采取的组织样本。

3.2 组织样本反复冻融。

建议：组织样本保存时，最好剪成小段保存，使用时取出其中一部分即可，避免样本的反复冻融导致 RNA 的降解。

3.3 操作间有 RNase 引入或没有佩戴一次性手套、口罩等。

建议：RNA 提取实验最好在单独的 RNA 操作间进行，并在实验前清理好实验桌，实验时佩戴一次性手套、口罩，最大程度上避免 RNase 引入导致的 RNA 降解。

3.4 试剂在使用过程中被 RNase 污染。

建议：更换新的植物总 RNA 提取系列试剂盒进行相关实验。

3.5 RNA 操作时所用的离心管、枪头等有 RNase 污染。

建议：确认 RNA 提取时所用到的离心管、枪头、移液器等都是 RNase-Free。

4. RNA 中含有 DNA 污染

4.1 提取的起始材料超过 50 mg

建议：步骤 1-样品处理时用天平称取粉末重量，不要超过 50 mg，否则样品的核酸量会超过 DNA

清除柱 CS 的处理极限，导致洗脱下的 RNA 有基因组 DNA 的污染。

4.2 省略了步骤 3-去除基因组污染步骤。

建议：步骤 3-去除基因组污染步骤必不可少，不能省略。DNA 清除柱 CS 能极大限度的去除上清液中的基因组 DNA，使用裂解液 RL plus 洗脱下的 RNA 基本无基因组 DNA 的污染。

4.3 跳过了使用去蛋白液 RD 的漂洗步骤（见操作步骤第 6 步）。

建议：这一步骤对于除去残留的 DNA 以及杂质蛋白十分重要，一定不能省略，否则将会导致纯化得到的 RNA 中含有 DNA 污染和蛋白污染。

5. 纯化获得的 RNA 影响下游实验

经吸附柱纯化的 RNA，如果盐离子、蛋白质含量过多会影响下游实验，比如：逆转录、Northern Blot 等。

1. 洗脱后的 RNA 有盐离子残留。

建议：确认漂洗液 RW 中添加了正确体积的乙醇，并按操作说明的离心转速进行 2 次 RW 洗涤吸附柱（见操作步骤第 7，8 步）。

2. 洗脱后的 RNA 有乙醇残留。

建议：确认 RW 第二次洗涤后，按操作说明的对吸附柱进行空管离心操作（见操作步骤第 9 步），如果还有乙醇残留，可以将空管离心后吸附柱开盖常温放置 5 min，以最大程度上去除乙醇残留。