

Imagen®

GenePure Plus Plantpoly RNA Maxi Kit
(Polysaccharides and Polyphenols Rich)
GenePure Plus 多糖多酚大量植物 RNA
快速提取试剂盒

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonix.com/>

CODONIX

RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

GenePure Plus 多糖多酚大量植物 RNA

快速提取试剂盒

目录号 RE123

使用说明书

网站: www.codonx.com

咨询电话: 010-56315162

技术支持 QQ: 3090544158

1/适用范围

2/试剂盒组成、储存、稳定性

3/储存事项

4/产品介绍

5/产品特点

6/注意事项

7/操作步骤

1/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gDNA残留, 一般不需要使用DNase消化, RNA可直接用于PCR, 荧光定量PCR。

2/试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	10 次 (RE123-01)
裂解液 LBT	室温	100 ml
裂解液 LBT Plus	室温	50 ml
去蛋白液 PRS	室温	60 ml
漂洗液 RB	室温	25 ml X 2 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
PLA	室温	10 ml
基因组 DNA 清除柱 CC 和收集管 CT	室温	10 套
RNase-free 吸附柱 AC 和收集管 CT	室温	10 套

本试剂盒在室温储存 6 个月不影响使用效果。

3/储存事项:

- 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
- 不合适的储存于低温 (4°C 或者 -20°C) 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°C - 25°C) 进行。
- 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。

4/产品介绍:

本公司在独家推出 GenePure 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，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液/β-巯基乙醇迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，植物 RNA 助提剂 PLA 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，基因组 DNA 被清除而 RNA 被选择性洗脱滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离子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。

5/产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 60 分钟内完成。
4. 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。
5. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.9~2.0，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

6/注意事项

1. 所有的离心步骤均可在室温完成，使用可容纳 50ml 离心管的离心机。
2. 需要自备乙醇，一次性注射器（可选），研钵。
3. 裂解液 LBT 和裂解液 LBT Plus 和去蛋白液 PRS 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，需要用大量清水或者生理盐水冲洗。
4. 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，本公司的 GenePure 系列 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留（一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见）影响不是很大，如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 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PRS漂洗前,直接在吸附柱AC上进行DNase I处理。请联系我们索取具体操作说明书。
5. RNA 纯度及浓度检测:

完整性: RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件: 胶浓度 1.2%; 0.5×TBE 电泳缓冲液; 150v, 15 分钟)检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA, 电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。动物 rRNA 大小分别约为 5 kb 和 2kb, 分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍, 否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度: OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数 (10mM Tris, pH7.5) 在 1.8-2.1 之间。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品, 假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数 1.8-2.1 之间, 在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间, 但这并不表示 RNA 不纯。

浓度: 取一定量的 RNA 提取物, 用 RNase-free 水稀释 n 倍, 用 RNase-free 水将分光光度计调零, 取稀释液进行 OD₂₆₀, OD₂₈₀ 测定, 按照以下公式进行 RNA 浓度的计算: 终浓度 (ng/μl) = (OD₂₆₀)×(稀释倍数 n)×40

7/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 RB 瓶加入指定量无水乙醇!

1. 直接研磨法 (推荐):

a. 新鲜植物组织称重后取 1-2g 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 1-2g 放入研钵), 加入 **10 体积 (10ml)** LBT 和 **1 体积 (1ml)** PLA 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 LBT 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

注: PLA 是提取多糖多酚含量丰富的困难样品不可缺少成分。提取普通植物组织可以不加 PLA, RNA 产量可能会提高一些。

b. 将裂解物转入离心管, 剧烈摇晃振荡 15 秒, 10,000-13,000x g 离心 10 分钟 (如果离心机转速低, 可适当延长离心时间), 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLA, 小心取裂解物上清 (需计算体积) 转到一个新离心管。

c. 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, 立即剧烈振荡混匀, 不要离心。

d. 立刻接**操作步骤**项下 3。

2. 液氮研磨法:

a. 取 10ml 裂解液 LBT, 转入 50ml 离心管中, 加入 1ml PLA 混匀备用。

b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后, 取 1-2g 细粉转入上述装有 LBT 和 PLA 的离心管, 立即用手剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。

在 56°C 温育 1-3 分钟有助于裂解植物, 但是淀粉含量高的植物不能温育, 因为提高的温度可能导致淀粉膨胀。

c. 用带钝针头的一次性 5ml (配 0.9mm 针头) 注射器抽打裂解物 10 次或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 10,000-13,000x g 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLA, 将所有裂解物上清转到一个新离心管。

e. 较精确估计裂解物 (上清) 体积, 加入 **0.5 体积** 的无水乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即剧烈振荡混匀, 不要离心。

f. 立刻接**操作步骤**项下 3。

3. 将混合物加入一个基因组清除柱 CC 中 (清除柱 CC 放入收集管 CT 中) 10,000-13,000x g 离心 5 分钟 (确保全部通过, 膜上无残留液体, 否则应加大转速和时间), 弃掉废液。

4. 将基因组 DNA 清除柱 CC 放在一个干净 50ml 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 CT），在基因组清除柱 CC 内加 5ml 裂解液 LBT Plus，13,000x g 离心 2 分钟，收集滤液（RNA 在滤液中）加用微量移液器较精确估计滤过液体积（通常为 4-5ml 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. 将混合物加入一个 RNA 吸附柱 AC 中（吸附柱 AC 放入收集管 CT 中）10,000-13,000x g 离心 5 分钟（确保全部通过，膜上无残留液体，否则应加大转速和时间），弃掉废液。
6. 加 6ml 去蛋白液 PRS，室温放置 1 分钟，12,000x g 离心 2 分钟，弃掉废液。
7. 加入 10ml 漂洗液 RB（请先检查是否已加入无水乙醇!），10,000-13,000x g 离心 1-2 分钟，弃掉废液。加入 10ml 漂洗液 RB，重复一遍。
8. 将吸附柱 AC 放回空收集管 CT 中，13,000x g 离心 5 分钟以干燥膜基质残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，室温或者烘箱晾干几分钟。
9. 取出吸附柱 AC，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 500 μ l -1ml RNase free **H₂O**（事先在 70-90 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好），室温放置 3 分钟，12,000x g 离心 2 分钟。
10. 如果预期 RNA 产量>0.6mg，加 300-500 μ l RNase free **H₂O** 重复步骤 9，合并两次洗脱液，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。

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com

