

EASYspin Universal Plant RNA Kit**EASYspin 通用植物 RNA 快速提取试剂盒/DNase I**

目录号: RN52

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次(RN5201)
裂解液 RPA	室温	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	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
DNase Buffer	-20℃	1.25 ml x 2
RNase free DNase I	-20℃	0.25 ml
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

本试剂盒按照各成份指示储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 常温成份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:

独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶,然后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, DNase 直接在柱上消化残留 DNA,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 β -巯基乙醇/苯酚/氯仿，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 简捷，单个样品操作一般可在 40 分钟内完成，世界上最简单快速的试剂盒。
3. 配套 DNase I 柱上消化，得到的 RNA 不残留 DNase 消化，可直接用于反转录 荧光定量 PCR、二代测序、芯片、RACE 等实验。
4. 世界领先，是同类产品中适应性最广泛的试剂盒，可以提取包括水稻、玉米、小麦、拟南芥、番茄、烟草和一般多糖多酚如棉花、冬青等植物。
5. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.0~2.2，无 DNA 残留，可直接用于荧光定量 PCR、RT-PCR、芯片、二代测序、Northern-blot 等各种实验。

❖ 注意事项

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机。
2. 需要自备乙醇，研钵(可选)。
3. 裂解液RPA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。**

❖ 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（推荐）：

- 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 **1 ml** 裂解液 RPA **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 RPA 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。
- 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。
- c. 取 **480 μ l** 裂解物上清（在不超过 RNA 吸附柱能力的情况下可以取更多或者全部上清，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:

- a. 取 500 μ l 裂解液 RPA, 转入 1.5ml 离心管中。
- 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 RPA 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 13,000 rpm 离心 5-10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。
- e. 取裂解物上清(在不超过 RNA 吸附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 RPA 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。
4. 加 350 μ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 1 分钟, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
5. DNase I 工作液配制: 取 45 μ l DNase I buffer 和 5 μ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液(处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液)。
6. 向吸附柱 RA 中央加入 50 μ l 的 DNase I 工作液, 室温(20-30 $^{\circ}$ C)放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上, 不要让工作液滴在 O 型圈或是离心柱管壁上。
7. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
8. 加入 500 μ l 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 500 μ l 漂洗液 RW, 重复一遍。
9. 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。
10. 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 30-50 μ l RNase free water (事先在 70-90 $^{\circ}$ C 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。

11. 如果预期 RNA 产量>30μg, 加 30-50μl RNase free water 重复步骤 10, 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 RNA 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。

注意: 如果不需要做荧光定量 PCR, 仅仅做普通的反转录, 克隆基因片段, 可以省略 DNA 酶柱上消化的步骤, 具体就是第 4 步骤的“加 350μl 去蛋白液 RW1”改成“加 700μl 去蛋白液 RW1”, 同时省略步骤 5, 6, 7。

附录 1: 使用 EASYspin/EASYspin Plus 系列植物 RNA 快速提取试剂盒发表的文章 100 多篇, 更多植物 RNA 提取试剂盒文章请参考主页 www.aidlab.cn 发表文章栏目:

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 毛桃: Cloning and Phylogeny Analysis of PpAP2 Floral Homologous Genes in Peach. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(7): 99-104
6. 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.
7. 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.
8. 荞麦和拟南芥: Ectopic expression of *FaesAP3*, a *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) AP3 orthologous gene rescues stamen development in an *Arabidopsis ap3* mutant. Gene 2014, 550(2): 200-206
9. 玫瑰花: Precise spatio-temporal modulation of ACC synthase by MPK6 cascade mediates the response of rose flowers to rehydration. The Plant Journal 2014, 79(6): 941-950
10. 棉花和拟南芥: Functional characterization of GhAKT1, a novel Shaker-like K⁺ channel gene involved in K⁺ uptake from cotton (*Gossypium hirsutum*). Gene 2014, 545(1): 61-71
11. 棉花 1: Gibberellin Overproduction Promotes Sucrose Synthase Expression and Secondary Cell Wall Deposition in Cotton Fibers. PLoS ONE 2014, 9(5): e96537. doi:10.1371/journal.pone.0096537
12. 苹果: Low Medium pH Value Enhances Anthocyanin Accumulation in *Malus Crabapple* Leaves. PLoS ONE 2014, 9(6): e97904. doi:10.1371/journal.pone.0097904