

# 目录

产品简介.....	2
贮存条件和稳定性.....	2
产品组分.....	2
实验前准备.....	3
操作步骤.....	4
疑难问题解答.....	7

## 产品简介

EZgene™ 多糖多酚复杂样本植物RNA提取试剂盒可以快速简单地从各种来源的植物组织中纯化高质量的总RNA，30分钟内完成RNA提取。整个提取过程无需酚氯仿抽提和乙醇沉淀，使用DNA Clearance Column可以有效的清除基因组，纯化好的总RNA可直接用于mRNA分离，RT-PCR，Northern杂交等下游分子实验操作。

## 贮存条件和稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存12个月。所有组分室温（15-25℃）保存。

## 产品组分

Catalog#	R8611-00	R8611-01	R8611-02
Preps	4	50	250
Buffer RLA	4 mL	50 mL	250 mL
Buffer RLB	1 mL	8 mL	40 mL
Buffer RLA Plus	2 mL	25 mL	125 mL
Buffer RW1	3.2 mL	40 mL	200 mL
Buffer RW2	1 mL	10 mL	5 x 10 mL
DEPC-Treated ddH <sub>2</sub> O	1 mL	10 mL	50 mL
Plantaid	400 µL	5 mL	25 mL
RNA Columns	4	50	250
DNA Clearance Columns	4	50	250
1.5 mL RNase-free Microfuge Tubes	4	50	250
User Manual	1	1	1

## 实验前准备

第一次使用本产品，请仔细阅读说明书熟悉操作步骤，按说明书要求准备好使用过程中用到的各种材料。

### 重要提示：

- ⚙ 第一次使用前，请按照瓶子上的标签在Buffer RW2中加入无水乙醇。
- ⚙ 如果样本是复杂的样品，请阅读第 6 页的补充说明。
- ⚙ 关于DNA的微量残留，个别特殊情况如DNA含量过于丰富造成残留，建议使用DNase I（可从BIOMIGA购买）消化基因组。

## 用户材料自备

- ⚙ 台式微型离心机和1.5 mL或者2.0 mL RNase-Free离心管
- ⚙ 真空负压装置（如果使用真空操作步骤）
- ⚙ 无水乙醇

# 操作步骤

## 1. 直接研磨法（提取简单植物样品推荐此法）

- a. 称取100 mg新鲜植物组织迅速剪成小块放入研钵（冰冻保存或液氮保存的样品可直接称取 100 mg 后放入研钵）。加入**10 倍体积**（1mL）**Buffer RLA**和**1倍体积**(100  $\mu$ L) **Plantaid** 到离心管中，瞬时涡旋，充分打散组织，至溶液中无组织块。
- b. 将裂解物转移至离心管，剧烈摇晃振荡15秒，13,000 rpm 离心 5- 10 分钟。
- c. 转移 480  $\mu$ L上清液至新离心管（若需要提高产量，可增加上清液的取用量），加入上清1/2 体积的无水乙醇，吹打混匀后立即进行步骤3。

## 2. 液氮研磨法（提取复杂、易降解样品时推荐此法）

- a. 取**500  $\mu$ L Buffer RLA** 至1.5 mL 离心管，加入 **50  $\mu$ L Plantaid** ，混匀备用。
- b. 称取 50 mg 经液氮研磨的植物组织粉末至含有 RLA-Plantaid 混合液的离心管中，立即剧烈振荡20秒后用枪头吹打混匀或涡旋振荡使充分裂解。
- c. 将裂解物 13,000 rpm 离心5- 10 min。
- d. 转移上清至新离心管，加入上清1/2 体积的无水乙醇，吹打混匀后立即进行步骤3。

**注意：**此法可相应增加样品量及试剂量以提高产量。

3. 转移上述混合液到 **DNA Clearance Column** 中，12,000 rpm离心2分钟，弃废液。
4. 将 **DNA Clearance Column** 放在干净的 2 mL 离心管中，加入**500  $\mu$ L Buffer RLA Plus**，12,000 rpm 离心30秒，收集滤液（RNA存在于滤液中），加入1/2体积的无水乙醇，立即吹打均匀。
5. 转移以上混合液至一个带有收集管的 **RNA Column** 中（包括可能生成的任何沉淀），室温下，12,000 rpm离心2分钟，弃废液，将吸附柱重新转移至收集管中。
6. 加入**700  $\mu$ L Buffer RW1**，室温静置 1 分钟后 12,000 rpm 离心30 秒，弃废液，将吸附柱放回到收集管中。
7. 加入**500  $\mu$ L Buffer RW2**，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回到收集管中。

**注意：**确保无水乙醇已加入到Buffer RW2中。

8. 重复步骤7。
9. 12,000 rpm 离心2分钟，去除残留的乙醇。  
**注意：**乙醇的残留将会降低洗脱效果和影响下游实验，开盖离心或者适当延长离心时间，将有助于乙醇的去除。
10. 将RNA Column放入一个1.5 mL RNase-Free Microfuge Tube 中，加入**30-50  $\mu$ L DEPC-Treated ddH<sub>2</sub>O**，室温放置 1分钟，12,000 rpm离心1分钟洗脱RNA。提取到的RNA可直接用于后续实验或者 -80°C 存放。
11. 如果要提高 RNA 产量，加入 **30-50  $\mu$ L DEPC-Treated ddH<sub>2</sub>O**，重复步骤 10，合并两次洗液；如果要提高 RNA 浓度，使用第一次的洗脱液加回到吸附柱中重复步骤10。  
**注意：**建议RNA用于下游实验之前，先进行质量检测。经变性琼脂糖凝胶电泳后，会有清晰的28S和18S条带，以及中间弥散的mRNA条带，其中28S条带是18S条带亮度的1.5-2倍。有时还包括跑在最前面的较暗的5S条带。如果条带不清晰或者弥散，可能是提取过程中RNA发生了降解或者材料在保存过程中RNA发生了降解。小于200bp的RNA分子不能有效结合到吸附柱上。A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值在1.8~2.0一般对应着RNA纯度在90- 100%。

## 补充说明.

有一些很复杂的样品若使用裂解液 RLA 提取失败或者产量较低，可尝试使用裂解液 RLB，用裂解液 RLB 测试的松针、番茄叶等表明可提高产量一至几倍。

## 附录:

R8611植物RNA提取试剂盒使用裂解液RLB操作步骤:

1. 第一次使用前请先在漂洗液 RW2 瓶加入指定量无水乙醇。
2. 取 1 mL 裂解液 RLB 至离心管内(如果 RLB 有析出或者沉淀需先置于 65°C 水浴重新溶解)，在裂解液RLB 中加入5%  $\beta$ -巯基乙醇 (1 mL RLB 加50  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇)。颠倒混匀后 65°C 水浴预热。
3. 用液氮研磨新鲜样本或 -70°C 冷冻的材料至粉末状。
4. 转移100- 150 mg粉末 (水分少的样品如种子叶片等可加100 mg，水分多的样品如西瓜可多加一些) 加至预热的Buffer RLB (已加有 $\beta$ -巯基乙醇) 离心管中，立即涡旋 30—60 秒或者用吸头吹打混匀裂解，然后于 65°C 水浴5分钟，中间颠倒1-2次帮助裂解。

**注意:**  $\beta$ -巯基乙醇是裂解液 RLB 的重要成分，必要的时候可以提高终浓度 到10-20。

5. 振荡混匀后室温 12,000 rpm 离心10分钟。
6. **取上清至新离心管** (若需要提高产量，可增加上清液的取用量)。加入上清1/2 体积的无水乙醇，立即吹打混匀后立即接第4页操作步骤的步骤3。

**注意:** 若上清表面有漂浮物，用吸头挑开吸取下面液体即可。

该试剂盒的适用性较广，可提取洋葱、大豆、芜菁、紫菜、黄鹤菜、番茄、水稻、荞麦、拟南芥、棉花、木瓜、柑橘、葡萄、桃子、苹果、櫻桃、石斛、青杆、茶梅、牡丹、东南景天、海棠、玉兰、雪莲、油松、白杨、菊花、玫瑰花、梔子、亚洲百合、山苍子、五倍子、葛根、人参、丹参、油桐、毛泡桐、油茶、海藻、松针等100多种样品。

## 疑难问题解答

问题	可能原因	改进建议
A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> 比值	蛋白质残留	用酚氯仿进行抽提，但是40%的RNA可能会损失。
	盐分残留	加入2.5倍体积的无水乙醇，终浓度0.1 M的NaCl沉淀RNA，-20°C放置30分钟，4°C条件下，10,000 x g离心15分钟，加入DEPC-Treated ddH <sub>2</sub> O溶解RNA。
RNA收获量低	样品中RNA降解	采集样品后迅速用液氮冷冻，并保存在-70°C。
	样品量超过吸附柱结合最大结合量	使用过多的样品反而会降低RNA的收获量，请适当减少样品的量。
	乙醇未加入到Buffer RW2中	加入无水乙醇到Buffer RW2中，并做好标记。
基因组残留	RT-PCR反应中加入了过多的起始样品量	RT-PCR反应中模板量到 50- 100 ng.
	样品中含有过多的DNA	减少起始样品的量，大多数组织材料中，30 mg或者少于30 mg的起始材料基本不会有基因组污染。

## 购买须知

根据说明书使用时，本产品应按其标签和BIOMIGA的文献中所述执行。BIOMIGA不提供任何其他类型的明示或暗示，包括但不限于适销性或适合某一特定目的的保证。在选择BIOMIGA时，违反本保证的，BIOMIGA唯一的义务和买方的唯一补救措施是更换产品，BIOMIGA应当没有任何直接或间接的，或使用引起的附带损害，或无法使用它产品的责任。如需技术支持或了解更多产品信息，请致电400- 115-2855与我们联系，或访问我们的网站：[www.biomiga.com.cn](http://www.biomiga.com.cn)。

BIOMIGA（中国）  
全国服务热线：400- 115-2855  
邮箱：[info@biomiga.com.cn](mailto:info@biomiga.com.cn)