



RNAPure Plant Kit (DNase I)

植物RNA提取试剂盒 (DNase I)

目录号： CW0559S (50 preps)

保存条件： DNase I及10×Reaction Buffer -20℃保存，其它组分室温（15-30℃）。

产品内容

Component	CW0559S 50 preps
DNase I	1000 U
10×Reaction Buffer	1000 μl
Buffer RL	35 ml
Buffer RLC	35 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	11 ml
RNase-Free Water	10 ml
Spin Columns FL with Collection Tubes	50
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	50

产品简介

本试剂盒用于从各种植物中提取纯化高品质总RNA，也适用于真菌菌丝RNA的提取。独特的分离柱，用于匀质化和过滤高粘度的植物或真菌裂解物，同时采用硅基质膜吸附RNA进行纯化，使多聚糖等各种污染物通过洗涤被有效去除，经洗脱的RNA可直接用于各种下游实验。由本试剂盒提取RNA分子量大于200碱基，纯度高，几乎无DNA残留。如果是对微量DNA非常敏感的RNA实验，残留的DNA可利用无RNase的DNase在柱上进行消化去除。提取的RNA可用于Northern Blot、Dot Blot、RT-PCR和体外翻译等实验。

自备试剂：β-巯基乙醇、无水乙醇（新开封或提取RNA专用）。

实验前准备及重要注意事项

1. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 配制溶液应使用无RNase的水。
 - 3) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
2. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180℃高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无RNase的水。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
3. 提取的样品避免反复冻融，否则影响RNA提取的量和质量。
4. Buffer RL在使用前请加入β-巯基乙醇，1 ml Buffer RL加10 μl β-巯基乙醇。加入β-巯基乙醇的Buffer RL室温可保存1个月。Buffer RLC使用时不需加β-巯基乙醇。
5. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在Buffer RW2中加入无水乙醇。
6. Buffer RL和Buffer RLC如果产生沉淀，请加热使其溶解后室温放置。
7. 所有离心步骤均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。

操作步骤

1. **50-100 mg**植物组织在液氮中迅速研磨成粉末，加入**600 μ l Buffer RL (使用前检查是否加入 β -巯基乙醇) 或Buffer RLC**。涡旋振荡使其充分裂解。
注意：1) Buffer RL主要成分为异硫氰酸胍，适用于大多数植物组织的裂解。但有些植物组织（如玉米的胚乳），由于次级代谢产物较特殊，异硫氰酸胍使样品产生沉淀，导致RNA提取效果不佳，此时可加入Buffer RLC替代Buffer RL。
2) 56 $^{\circ}$ C 孵育1-3分钟有助于组织的裂解，但是淀粉含量高的植物不要进行高温孵育。
2. 将步骤1所得全部液体转移至已装入收集管的吸附柱(Spin Columns FL)中，12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心2分钟，将收集管中的上清液转移到一个新的离心管（自备）中。
注意：1) 在吸取液体时可以将枪头尖端剪掉，便于取样。
2) Spin Columns FL可以除去大部分的碎片，但仍会有小部分流出，离心后会在收集管内形成沉淀，在进行下一步时注意避免吸到沉淀。
3. 在步骤2所得干净的裂解液中加入**0.5倍体积的无水乙醇**，迅速混匀。
注意：加入乙醇后可能会产生沉淀，但不影响后续试验。
4. 将上步得到的溶液转移到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RM）中，若一次不能将全部溶液加入吸附柱中，请分两次转入；12,000 rpm离心15秒，弃掉废液，将吸附柱重新放回收集管中。
5. 向吸附柱中加入**350 μ l Buffer RW1**，12,000 rpm离心1分钟，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。
6. 配制DNase I 混合液：取**52 μ l RNase-Free Water**，向其中加入**8 μ l 10 \times Reaction Buffer**和**20 μ l DNase I (1 U/ μ l)**，混匀，配制成终体积为80 μ l的反应液。
7. 向吸附柱中直接加入**80 μ l DNase I 混合液**，20-30 $^{\circ}$ C 孵育15分钟。
8. 向吸附柱中加入**350 μ l Buffer RW1**，12,000 rpm离心1分钟，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。
9. 向吸附柱中加入**500 μ l Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇)**，12,000 rpm离心15秒，弃废液。
10. 重复步骤9。
11. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm离心1分钟，将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干吸附柱中的无水乙醇。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR等)。

12.将吸附柱装入新的离心管中，向吸附膜的中间加入30-50 μl RNase-Free Water，室温放置1分钟，12,000 rpm离心1分钟，得到的RNA溶液保存在-70 $^{\circ}\text{C}$ ，防止降解。

注意：1) RNase-Free Water体积不应小于30 μl ，体积过小影响回收率。

2) 如果要提高RNA的产量，可用30-50 μl 新的RNase-Free Water重复步骤12。

3) 如果要提高RNA浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤12。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途