

## 植物 RNA 小量提取试剂盒

### 一、产品简介

本试剂盒不使用苯酚和氯仿等有毒试剂, 适合从 ≤100 mg 植物样品中提取 RNA。

本试剂盒采用优化的裂解液 Buffer RL 快速裂解细胞释放 RNA, 配合 β-巯基乙醇迅速灭活 RNase。Buffer RL 所含试剂成分能解离 RNA 与多糖和多酚等代谢产物形成的复合物, 使 RNA 保持游离状态, 方便后续操作。

预过滤柱-RD 有效截留样品碎块和完整性较高的基因组 DNA; 滤液中为游离的 RNA, 加入 Buffer RBP 调整结合条件, 过滤枪头去除可能析出的蛋白和多糖, 大分子 RNA(包括 rRNA 和 mRNA)结合至 RNA 吸附柱-A, 大部分小分子 RNA(包括 tRNA 和降解为 5S 的小 RNA)不能被有效吸附而去除。

四种洗涤液分别去除残留的杂质: Buffer WAR 洗涤去除残留的蛋白、色素; Buffer WD 洗涤去除残留的小分子 DNA、多糖; Buffer RW2 洗涤去除残留的盐; 无水乙醇洗涤去除残留的多酚和脂溶性色素。最后, 用去离子水洗脱获得高纯度 RNA。

### 二、试剂盒组成和储存

组成内容	RK101-01 (20 次)	RK101-02 (50 次)	原理与用途
Buffer RL*	15 ml	35 ml	裂解样品、抑制内源 RNase
Buffer RBP	10 ml	10 ml×2	调整结合条件
Buffer WAR	15 ml	15 ml×2	洗涤去蛋白
Buffer WD	15 ml	15 ml×2	洗涤去多糖
Buffer RW2 <sup>‡</sup>	7 ml	16 ml	洗涤去盐
diH <sub>2</sub> O*	15 ml	15 ml	洗脱 RNA
预过滤柱-RD	20 套	50 套	截留样品碎片、吸附完整的 DNA
1 ml 枪头 (透明)	20 个	50 个	与过滤枪头配套使用
过滤枪头 (蓝色)	20 个	50 个	去除可能析出的蛋白和多糖
RNA 吸附柱-A	20 个	50 个	吸附 RNA
收集管	40 个	50 个×2	接收废液
1.5 ml 离心管	20 个	50 个	接收洗脱的 RNA
说明书	1 份	1 份	

\*第一次使用前按试剂瓶所示体积加入β-巯基乙醇至终浓度为1%, 室温放置一周稳定, 重复加入β-巯基乙醇至终浓度5%不影响使用效果。

<sup>‡</sup>Buffer RW2: 按试剂瓶所示体积添加无水乙醇, 混合均匀。

\*diH<sub>2</sub>O: 无DNase&RNase, 不含叠氮化钠等防腐剂, 建议分装后存放于4℃避免污染和长菌。

所有试剂盒组成成分为室温储存。

### 三、注意事项

1. Buffer RL 和 Buffer WAR 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
2. 使用后应及时盖紧试剂瓶盖, 以免影响下次使用效果, 尤其是 Buffer RBP、Buffer WAR 和 Buffer RW2。
3. 尽可能使用新鲜收集的样品, RNA 产量与起始样品中 RNA 的完整性有关, 降解为小片段的 RNA 不能被有效回收。
4. 保持实验的连贯性, 任何步骤不要停留过长时间。

### 四、实验准备

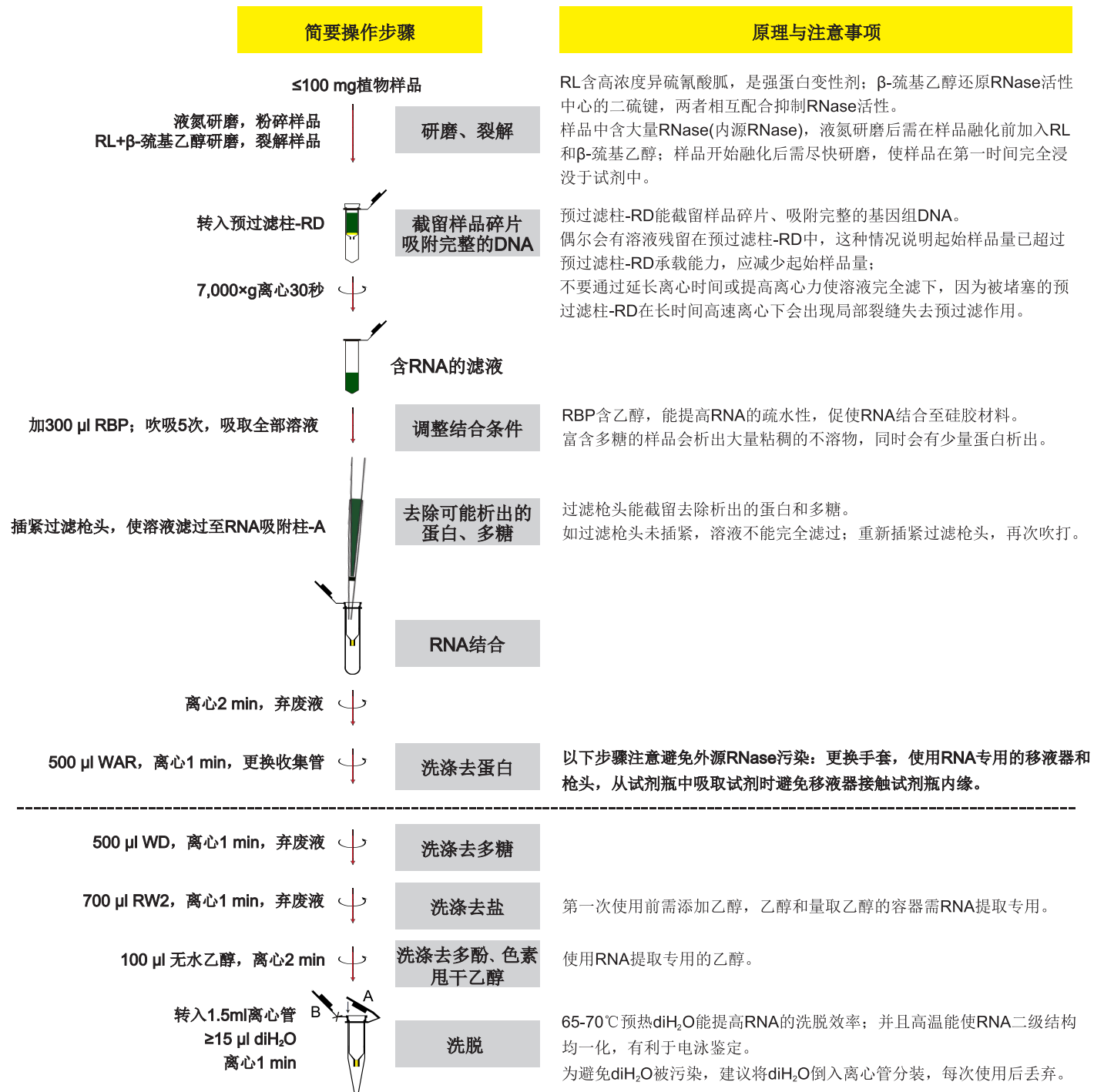
1. 液氮, 研钵等研磨工具。
2. β-巯基乙醇。第一次使用前按试剂瓶所示体积在 Buffer RL 中添加 β-巯基乙醇至终浓度为 1%, 室温放置一周稳定, 重复加入 β-巯基乙醇至终浓度 5% 不影响使用效果; 如果实验间隔时间较长, 也可以在每次使用时加入 Buffer RL 1% 体积的 β-巯基乙醇。
3. 第一次使用前, 按试剂瓶所示体积在 Buffer RW2 试剂瓶中加入无水乙醇, 混合均匀。

**! 乙醇和量取乙醇的容器需提取 RNA 专用, 如果没有合适的容器量取乙醇, 可根据乙醇的密度计算重量直接加入试剂瓶中。**

无水乙醇的密度为 0.7893 g/ml, 20 ml 无水乙醇为 15.8 g, 45 ml 无水乙醇为 35.5 g, 185 ml 无水乙醇为 146 g。

4. 提取 RNA 专用的无水乙醇。
5. 可选: 65-70℃ 预热 diH<sub>2</sub>O。

## 五、操作流程



## 六、操作步骤

所有离心时间按使用台式快速离心机设定, 通常 10 秒内可达最高转速/离心力; 如使用慢升速离心机, 离心时间需延长 30 秒。

所有离心条件为室温; 如未注明离心力, 均为 12,000-16,000×g; 如离心机只能设定转速, 设定为低于最高转速 1,000 rpm。

RNA 吸附柱-A 中加入溶液后可能会有白色纤维层从底部脱落悬浮于溶液中, 不影响使用效果。

### 1. 称取 ≤100 mg 植物样品。

### 2. 根据实验条件选择如下方法研磨和裂解样品:

#### A 使用液氮和研钵研磨

A1. 将样品转入研钵, 加液氮, 用研磨杵敲碎样品, 等大部分液氮挥发后快速研磨; 再加入少量液氮, 再快速研磨 10-20 次;

A2. 立即加入 **600 μl Buffer RL** (如未在试剂瓶中加入 β-巯基乙醇或加入后超过一周, 此步骤加入 6 μl β-巯基乙醇), 快速研磨使 Buffer RL 覆盖样品;

A3. 室温放置或水浴加热, 样品开始融化后立即快速研磨至样品完全融化;

A4. 将 1ml 枪头剪掉 1-2 mm, 吸取 550 μl 溶液转入预过滤柱-RD(事先置于 2 ml 离心管中), 继续操作步骤 3。

#### B 使用液氮和往复震荡机研磨

B1. 将样品和钢珠加入 1.5 ml 离心管中, 固定于样品盒中; 将样品盒浸没在液氮中使样品完全硬化;

B2. 将样品盒置于往复震荡机中, 高速震荡使样品呈粉末状;

B3. 加入 **550 μl Buffer RL** (如未在试剂瓶中加入 β-巯基乙醇或加入后超过一周, 此步骤加入 5.5 μl β-巯基乙醇), 剧烈摇晃 20 次;

B4. 将溶液转入预过滤柱-RD(事先置于 2 ml 离心管中), 继续操作步骤 3。

#### C 使用液氮和研磨棒研磨

C1. 将样品转入 1.5 ml 离心管中, 灌入液氮使样品完全硬化;

C2. 用研磨棒快速研磨样品, 再灌入少量液氮, 快速研磨; 重复加液氮和研磨, 至样品呈粉末状;

C3. 加入 **550 μl Buffer RL** (如未在试剂瓶中加入 β-巯基乙醇或加入后超过一周, 此步骤加入 5.5 μl β-巯基乙醇), 剧烈摇晃 20 次;

C4. 将溶液转入预过滤柱-RD(事先置于 2ml 离心管中), 继续操作步骤 3。

#### D 研钵直接研磨(没有液氮的情况下可按此方法操作, 但此方法不能充分破碎细胞壁, 产量低于方法 A)

D1. 剪碎样品, 加 **600 μl Buffer RL** (如未在试剂瓶中加入 β-巯基乙醇或加入后超过一周, 在此步骤加入 6 μl β-巯基乙醇), 研磨至无明显的块状组织;

D2. 将 1ml 枪头剪掉 1-2 mm, 吸取 550 μl 溶液转入预过滤柱-RD(事先置于 2 ml 离心管中), 继续操作步骤 3。

### 3. 7,000×g 离心 30 秒, 丢弃预过滤柱-RD。

偶尔会有溶液残留在预过滤柱-RD 中, 这种情况说明起始样品量已超过预过滤柱-RD 承载能力, 应减少起始样品量;

不要通过延长离心时间或提高离心力使溶液完全滤下, 因为被堵塞的预过滤柱-RD 在长时间高速离心下会出现局部裂缝失去预过滤作用。

### 4. 在步骤 3 的滤液中加入 **300 μl Buffer RBP**; 将移液器调至 1 ml, 用试剂盒携带的 **1 ml 枪头** 缓慢吹吸 5 次, 吸取全部溶液; 将 **1 ml 枪头** 紧插在过滤枪头, 缓慢吹打使溶液滤过滴入 RNA 吸附柱-A(事先置于收集管中)。

如过滤枪头未插紧, 溶液不能完全滤过; 重新插紧过滤枪头, 再次吹打。

### 5. 离心 2 min, 弃废液, 将 RNA 吸附柱-A 放回收集管中。

### 6. 加入 **500 μl Buffer WAR**, 离心 1 min, 弃收集管, 将 RNA 吸附柱-A 放入另外一个干净的收集管中。

以下步骤注意避免外源 RNase 污染: 更换手套, 使用 RNA 专用的移液器和枪头, 从试剂瓶中吸取试剂时避免移液器接触试剂瓶内缘。

### 7. 加入 **500 μl Buffer WD**, 离心 1 min, 弃废液, 将 RNA 吸附柱-A 放回收集管中。

### 8. 加入 **700 μl Buffer RW2**, 离心 1 min, 弃废液, 将 RNA 吸附柱-A 放回收集管中。

### 9. 加入 **100 μl 无水乙醇**, 离心 2 min。

### 10. 将 RNA 吸附柱-A 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中, 在硅胶膜中央加 ≥15 μl diH<sub>2</sub>O, 离心 1 min。

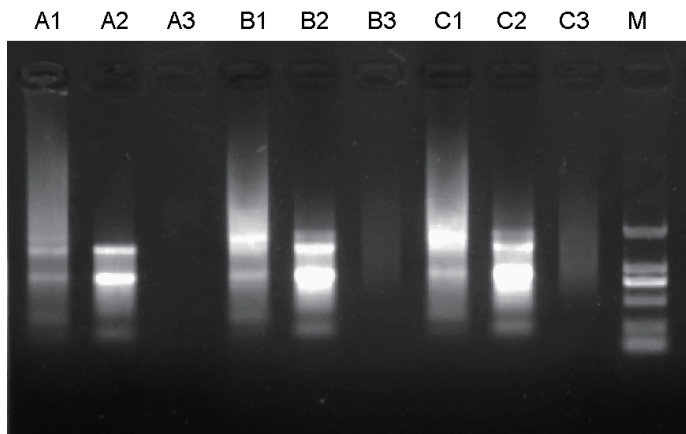
▲ 65-70°C 预热 diH<sub>2</sub>O 能提高 RNA 的洗脱效率; 并且高温能使 RNA 二级结构均一化, 有利于电泳鉴定。

▲ 重复洗脱可以提高洗脱效率。重复洗脱的两种方法:

a. 洗脱的 RNA 溶液转入 RNA 吸附柱中进行洗脱, 获得的 RNA 浓度高于方法 b;

b. 重新加入洗脱液进行洗脱, 洗脱效率高于方法 a。

## 七、实验示例



### 使用 RK101 从水稻根尖中提取 RNA

M: DL2000, 1%Agarose;

A1: 从 100 mg 水稻根尖中提取 RNA;

B1: 从 200 mg 水稻根尖中提取 RNA;

C1: 从 300 mg 水稻根尖中提取 RNA;

A2、B2、C2: 对应 A1、B1 和 C1, 60°C水浴 10min, 迅速放入冰水浴;

A3、B3、C3: 对应 A1、B1 和 C1, 加入 RNase 后 60°C水浴 10min。

实验结论:

1. 使用 RK101 提取的 RNA 二级结构未充分打开, 因此后续的逆转录过程不能省略预变性步骤;
2. 大部分小 RNA(主要是 tRNA 与 5SRNA)被去除, 因此逆转录可减少 RNA 用量, 比如 20  $\mu$ l 逆转录体系加入 0.5  $\mu$ g RNA;
3. 样品过量会造成明显的基因组 DNA 残留, 见 B3 和 C3。

## 八、常见问题解答

### Q1 RNA 产量忽高忽低

A1 不同于 Trizol 后续异丙醇沉淀的方法, 本试剂盒不能有效回收降解的 RNA 和 tRNA。如起始样品中 RNA 已降解, 或提取过程未按说明书操作导致 RNA 降解, 最终获得的 RNA 产量会明显下降。

### Q2 电泳鉴定有很多条带

A2.1 有些植物 rRNA 不止常见的 23S 和 16S 两种;

A2.2 本试剂盒获得的 RNA 保持天然二级结构, 比如 23S rRNA 有两种构型电泳时会出现 2 个条带。将洗脱的 RNA 加热能使二级结构均一化。

### Q3 RNA 琼脂糖凝胶电泳有什么注意事项?

A3 可以使用 1 $\times$ TAE 普通琼脂糖凝胶电泳。尽可能使用新鲜的电泳缓冲液, 凝胶浓度 1-1.5%, 高电压、短时间电泳, 比如 7V/cm 电泳 20 min。

可能残留的蛋白类 RNase 因负电荷量相对不足不能迁移进入琼脂糖凝胶, 加样后立即开始电泳能降低 RNA 被降解的概率。

建议使用 DL2000 作为 Marker, 琼脂糖凝胶中 23S rRNA 迁移率与 2 kb dsDNA 相似, 16S rRNA 迁移率与 1 kb dsDNA 相似。

将洗脱缓冲液预热或洗脱的 RNA 加热后进行电泳, 能使 RNA 二级结构均一化, 使 rRNA 条带更锐利。