

描述: 该试剂盒采用经典的萃取法进行动植物总 RNA 的提取, 配合玻璃珠抗杂质强的特点, 其获得的 RNA 产量稳定、提取成功率高。对多种困难类型的植物样本均适用, 包括多糖多酚含量较高的植物叶片、种子、根、茎等组织。除此外, 其也适用于: 动物组织、细胞、细菌、病毒液、全血、血清等样本的 RNA 提取, 整个用时在 30min 内完成。应用本试剂盒提取的 RNA 可直接用于 RT-PCR、NGS 测序等多种分子生物学实验。

组分

组 分	4T	50T
蛋白酶 K(10mg/ml)	50 μ l	550 μ l
Universal PL11	1 ml	12 ml
Universal DR22	1.8 ml	22 ml
氯仿替代物 B2	2.5 ml	30 ml
Washing Buffer(含乙醇)	5 ml	55 ml
W2 Buffer	1.8 ml	22 ml
玻璃珠	2.5ml	27ml
Nuclease Free H ₂ O	0.5 ml	6 ml
吸附柱芯(NP05)	4 套	50 套
2ml 吸附柱外套管	4 套	50 套

注意事项与准备工作:

- 1.1 Washing Buffer 中含有 70%乙醇, 使用时远离火源。
- 1.2 氯仿替代物 B2 为管制品氯仿的替代物(该溶液上层覆盖有水相, 使用时吸取下层红色油相), 沸点>150℃, 燃点>450℃, 毒性低于氯仿, 但仍建议在通风橱中使用。
- 1.3 PL11 和 DR22 溶液有强烈的腐蚀性, 使用时务必做好防护, 防止灼伤皮肤和眼睛。如有发生, 立即用大量的清水冲洗, 并就医。溶液如有结晶或析出, 可于水浴锅 56℃ 放置 2~3min 后, 即可使用。
- 1.4 玻璃珠溶液易沉淀, 使用前旋涡(或吹打)混合均匀成牛珠状浆液, 待用。
- 1.5 蛋白酶 K 于-20℃保存, 其它组分室温保存, 有效期为 2 年。

样本用量参考表

样品	用量	产量
新鲜种子	100~150 mg	10-40 μ g
新鲜根、茎、叶	100~150 mg	5-20 μ g
含水量较大果肉类	100~150 mg	2-5 μ g
培养细胞	10e7	20-60 μ g
抗凝全血	150 μ l	2-5 μ g
动物组织	50~100 mg	10-80 μ g

2 操作方法(样本准备)

- 2.1 机械钢珠研磨的样品: 取 200~300 mg 样品加入 500 μ l 的 ddH₂O, 研磨成浆液后(不离心), 取 200 μ l 浆液放入到 1.5ml EP 管中。
- 2.2 液氮研磨的样品: 取 75~150 mg 研磨样品加入到 1.5 ml EP 管中, 向样品中 200 μ l 的 ddH₂O, 旋涡 10s, 做成组织悬液。
- 2.3 培养的细菌、酵母、细胞: 用 200 μ l 的 ddH₂O 重悬后, 加入到 1.5 ml EP 管中。
- 2.4 病毒液、拭子液、灌洗液等液体样品: 直接吸取 200 μ l 加入到 1.5 ml EP 管中, 体积不足时, 用 ddH₂O 补足。
- 2.5 抗凝全血、血清、血浆: 吸取 100 μ l 加入到 1.5 ml EP 管中, 并加入 100 μ l 的 ddH₂O, 旋涡 10s。

3 操作方法(提取)

- 3.1 向上述样品悬液中, 加入 10 μ l 的蛋白酶 K 和 200 μ l 的 PL11, 旋涡混合 15s, 水浴锅 56℃ 放置 10~15min(期间可震荡混合 2-3 次)。
- 3.2 向上述溶液加入 400 μ l 的 Universal DR22, 旋涡混合 15s。
- 3.3 向上述溶液加入 500 μ l 的氯仿替代物 B2(下层红色油相)旋涡混合 15s。将 1.5ml EP 管放入离心机, 13000rpm 离心 1min。此时, 溶液分层, DNA/RNA 分布于上层无色水相中。
- 3.4 基因组 DNA 去除: 吸取 600 μ l 的上层无色水相, 加入到吸附柱中, 13000rpm 离心 15s, 此时基因组 DNA 结合于柱芯上, 将柱芯丢弃, 留穿柱液(此时在 2ml 吸附柱外套管中)。
- 3.5 向穿柱液中, 加入 500 μ l 的混合均匀后的玻璃珠浆液。盖上管盖, 旋涡 15s 混合均匀(或上下颠倒混合 4~6 次), 室温静置 1min, 使 RNA 结合到玻璃珠上。
- 3.6 将 2 ml EP 管放入离心机中, 4000rpm 离心 10s。倒掉上清液, 留底部玻璃珠沉淀, 此时 RNA 已吸附在玻璃珠上。
- 3.7 向玻璃珠沉淀加入 1 ml 的 Washing Buffer, 吹打松散玻璃珠, 并盖上管盖, 上下颠倒混合 2~3 次, 进行玻璃珠和管壁洗涤。放入离心机 4000rpm 离心 10s, 倒掉上清液。
- 3.8 用 400 μ l 的 W2 Buffer 重悬玻璃珠沉淀, 并转移到新的 1.5 ml EP 管中, 4000rpm 离心 10s。倒掉上清液, 留底部玻璃珠沉淀。
- 3.9 重新放入离心机中, 4000rpm 离心 10s, 用 10 μ l 的 Tip 头, 将管底部的残留 W2 Buffer 彻底吸取干净(务必吸取干净, 否则造成后续洗脱效率下降)。
- 3.10 向玻璃珠沉淀中加入 60~100 μ l 的 Nuclease Free H₂O, 用 Tip 头吹打松散玻璃珠沉淀, 此时 RNA 核酸分子被洗脱到水溶液中。4000rpm 离心 1min, 上清液即为 RNA。