

M5 Plant RNeasy Mini Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Plant RNeasy Mini Kit	20T	MF035-02
M5 Plant RNeasy Mini Kit	50T	MF035-05

【储存条件】

室温储存 12 个月不影响使用效果。本试剂盒所有溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，可在 37°C 水浴加热几分钟，恢复澄清后再使用。

【产品简介】

本产品配有聚合美独特研发的裂解液能迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，植物 RNA 助提剂帮助结合多糖多酚并通过离心去除，然后用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，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。本产品也可以用来提取丝状真菌或者复杂真菌的 RNA。

【产品特色】

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用 Whatman 特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 不需要苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀，快速方便，一般可在 25-30 分钟内完成。
3. 独有的植物 RNA 助提剂可以有效结合多糖多酚，提高清除效果，应用性极广，可以轻松提取棉花，松针等多糖多酚的样品。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.0-2.2，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

【产品组份】

	20T	50T	注意事项
裂解液 RLT	20 ml	50ml	室温密闭干燥保存
去蛋白液 RW1	15 ml	40ml	室温密闭干燥保存
漂洗液 RW	5 ml	10ml	初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇
RNA 助提剂 RX	2 ml	5 ml	室温密闭干燥保存
RNase-Free H ₂ O	10 ml	10ml	室温密闭干燥保存
RNase-Free 吸附套管(RA)	20 套	50 套	室温密闭干燥保存

【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，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 需要自备乙醇（尽量新开封或者 RNA 专用），研钵。
3. 裂解液 RLT 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，**操作时要戴乳胶手套，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。**
4. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：
 - 1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染。
 - 2) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - 3) RNA 在裂解液 RLT 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150°C 烘烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。
 - 4) 配制溶液应使用无 RNase 的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.1% (v/v)，37°C 放置过夜，高压灭菌。）
5. 关于 DNA 的微量残留：

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留，本产品采取了独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留（一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见）影响不是很大，如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR，我们建议在进行模板和引物的选择时：

 - 1) 选用跨内含子的引物，以穿过 mRNA 中的连接区，这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
 - 2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
 - 3) 将 RNA 提取物用 RNase-Free 的 DNase I 处理。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(cleanup), 请联系我们索取具体操作说明书。
 - 4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前，直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。请联系我们索取具体操作说明书。

6. 关于复杂植物样品提取残留较多 DNA 的情况有两个选项:

- 1) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前, 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 柱上消化处理。购买 DNA 酶柱上消化试剂盒, 前可先索取具体操作说明书。
- 2) 部分较复杂的植物样品提取时, 可能残留较多 DNA, 可以尝试本公司的 M5 Plant RNeasy plus Mini Kit (货号 MF037)。MF037 在 MF035 植物 RNA 提取试剂盒基础上, 又独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 DNA 残留, 在大多数情况下, 可以将 DNA 残留清除到紫外下观测不可见。

7. 关于特别复杂难提取植物样品提取失败或者产量低的情况:

一些特别复杂的植物样品提取, 如葡萄果实, 蓝靛果果实等, MF035 裂解液 RLT 无法提取, 需选择 MF045 多糖多酚/复杂植物 RNA 提取试剂盒。一些样品产量较低, 也可以尝试 MF045 多糖多酚/复杂植物 RNA 提取试剂盒。MF045 配有强力裂解液 CLB 选项, 在很多情况下, 可以提取复杂样品或者明显提高产量 (详情请看 MF045 说明书)。

【操作步骤】

<实验前请先阅读注意事项, 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量的无水乙醇!>

1. 直接研磨法 (提取简单植物样品推荐此法, 但是简单样品也可以用液氮研磨法):

- a. 新鲜植物组织称重后取 100-200mg 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 100-200mg 放入研钵), 加入 10 体积 (1ml) RLT 和 1 体积 (100 μ l) 植物助提剂 RX 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 RLT 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

<注: 植物助提剂 RX 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富的困难样品不可缺少成分>。

- 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, 去除不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的植物助提剂 RX。
- 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 (提取复杂, 易降解样品时推荐此法):

- a. 取 500 μ l 裂解液 RLT, 转入 1.5ml 离心管中, 加入 50 μ l 植物助提剂 RX 混匀备用。
- b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后, 取 50-100mg 细粉转入上述装有 RLT 和 RX 的离心管, 立即用手剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。
- c. 剧烈涡旋震荡 (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和结合有多糖多酚的植物助提剂 RX。
- 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 RLT 和 100 μ l 植物助提剂 RX 和 100-200mg 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 700 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. 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。
6. 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。
7. 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 H₂O (事先在 70°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。
8. 如果预期 RNA 产量 > 30 μ g, 加 30-50 μ l RNase-Free H₂O 重复步骤 7, 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>。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。