

## 尊敬的聚合美粉丝：

非常感谢您对聚合美的支持和对新事物的拥抱，

使用本产品前请认真阅读《温馨提示》和《操作说明书》。

### “繁可简”系列多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒使用“温馨提示”：

- 1、“繁可简”系列产品针对的是多糖多酚植物 RNA 提取。普通植物 RNA 提取建议用聚合美 MF035, MF037 或者 MF610 来做，因为杀鸡焉用牛刀，上述 3 个货号更便宜，节省实验室经费。
- 2、“繁可简”系列产品最大特点：**不需要苯酚，氯仿等有毒试剂**，也不需要乙醇沉淀；可在 25-30 分钟内完成单个样本提取。不同样本 RNA 含量差异非常大，通常 100mg 样本能提到 0.05-5ug 甚至更高质量 RNA。
- 3、常见多糖多酚植物包括：**中草药**如石斛/丹参/雪莲/人参；**植物果实**如葡萄/蓝莓/草莓/香蕉/苹果/梨/西瓜果肉/紫菜/仙人掌/芦荟；**复杂花卉和园艺植物**如月季/玫瑰/梅/牡丹花/冬青/松针/沙棘/胡杨等。**以及用其他品牌提不出来的样本**，都可以认为是多糖多酚样本。
- 4、处理的样本尽量新鲜采集，然后马上提取。如果需要长期保存样本，请用聚合美的“完璧纯”样本保存液（MF150），切勿用 trizol 或者 -80 度直接保存，以防 RNA 降解。具体原因可以参考聚合美公众号文章。
- 5、提完 RNA，不能只测 OD 值，必须要跑 RNA 电泳(**简易 RNA 电泳条件同 DNA 电泳**，只需要把电泳槽、梳子和胶板洗干净，用新的琼脂糖和电泳缓冲液配胶，跑胶：胶浓度 1%；1×TAE 电泳缓冲液；120V，15 min)。可以通过 28S，18S，5S rRNA 的条带来判断 RNA 的质量。
- 6、**只能通过电泳结果来判断 RNA 的质量**。RNA 的质量包括：完整性（28S：18S=2:1）、纯度（有没有蛋白污染，有没有 gDNA 污染，其他杂质污染等）和浓度。
- 7、只有在 RNA 没有降解，也没有污染的情况下，才能用 OD 值算 RNA 的浓度。要知道，如果 RNA 降解了，OD 变大，有蛋白污染 OD 也会变大，如果有 gDNA 污染 OD 也变大。
- 8、因为多糖多酚植物样本组分非常复杂，如果提取出来的 RNA 电泳结果图显示有 gDNA 污染，也是非常正常的，不必惊慌。后续反转录可以用**带 gDNA 清除的试剂盒（聚合美 MF949）**来处理，不影响 qPCR 结果。
- 9、聚合美在多糖多酚植物 RNA 提取领域的技术是顶尖的，我们敢于和任何品牌同场竞技，接受现场 PK。结果以电泳图为准，不能靠 OD 值。因为我们知道某些品牌存在人为操控，使得 OD 值比我们高很多，但是电泳条带不如我们，后续反转录和 qPCR 实验中他们的 Ct 值更大。

# M5 HiPer Horticulture Plant RNeasy Mini Kit

## “繁可简”园艺植物 RNA 提取试剂盒

### 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Horticulture Plant RNeasy Mini Kit	50T	MF994-01

**【储存条件】** 常温保存，组分若有沉淀，在 37°C 水浴加热恢复澄清后使用。

#### 【产品简介】

“繁可简”园艺植物 RNA 提取试剂盒，**不需苯酚、氯仿**，含有独家基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。**本产品具有强大的提取能力，针对复杂花卉和园艺植物 RNA 提取，把试剂盒组分进行了专门的优化，很多其他品牌提取失败的样本，我们能轻松提取出来。**独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，离心沉淀去除多糖多酚和次级代谢产物，然后裂解混合物用乙醇调节 RNA 结合吸附到基因组 DNA 清除柱，然后 RNA 被选择性洗脱滤过，吸附在基因组 DNA 清除柱上的残留 DNA 无法洗脱连同柱子一起丢弃从而清除掉 DNA。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序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 H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

#### 【产品特色】

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，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. 基因组 DNA 清除柱技术有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 典型的比值达 2.0-2.2。

#### 【产品组份】

	50T	注意事项
裂解液 CLB	50ml	
裂解液 RLT Plus	25ml	
去蛋白液 RW1	40ml	
漂洗液 RW	10ml	<b>初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇</b>
RNase-Free H <sub>2</sub> O	10ml	
基因组 DNA 清除套管	50 套	
RNase-Free 吸附套管(RA)	50 套	

**【注意事项】**

1. 所有的离心步骤均在室温完成（4°C 离心也可以），使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机。
2. 需要自备  $\beta$ -巯基乙醇、乙醇（尽量新开封或者 RNA 专用），研钵。
3. 裂解液 CLB、RLTplus 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. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
5. **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。）
6. **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。

**【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!>

**实验前准备：**取 1ml 裂解液 CLB 至离心管内（如果 CLB 有析出或者沉淀需先置于 65°C 水浴重新溶解），在裂解液 CLB 中加入 5%  $\beta$ -巯基乙醇（1ml CLB 加 50 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇）。颠倒混匀后 65°C 水浴中预热。多个样品按照比例放大准备。

**1. 直接研磨法（实验室无液氮情况下或者柔软易研磨植物样品推荐此法）：**

- a. 新鲜植物组织或者冰冻保存样品称重后取 100-200mg（水分少的样品可加 100-150mg，水分多的样品可多加一些）迅速剪成小块放入研钵，加入 1ml CLB（已加有  $\beta$ -巯基乙醇）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 CLB 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

< $\beta$ -巯基乙醇是裂解液 CLB 的关键成分，必要的时候可以提终浓度到 10-20%。如果特别复杂植物，可以尝试在裂解液中加入 PVP40 至终浓度 2%>。

- b. 将裂解物转入离心管，立即剧烈振荡 15 秒，短时放回 65°C 水浴中（5-10 min），中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。13,000rpm 离心 10 分钟，沉淀不能裂解的碎片。
- c. 取裂解物上清（在不超过基因组 DNA 清除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。

<若上清表面有漂浮物，用吸头挑开吸取下面液体即可>。

- d. 立刻接操作步骤的步骤 3。

## 2. 液氮研磨法（适用广泛，提取复杂难破碎，易降解样品时推荐此法）：

- a. 液氮中研磨新鲜或-70°C 冷冻的材料至细粉。
- b. 转移 100-200mg 细粉（水分少的样品可加 100-150mg，水分多的样品可多加一些）加至预热的裂解液 CLB（已加有  $\beta$ -巯基乙醇）离心管中。立即剧烈涡旋 30-60 秒或者用吸头吹打混匀裂解直得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- c. 短时放回 65°C 水浴中（5-10 min），中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。
- d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 10 分钟，沉淀不能裂解的碎片。
- e. 取裂解物上清（在不超过基因组 DNA 清除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。  
<若上清表面有漂浮物，用吸头挑开吸取下面液体即可>。
- f. 立刻接操作步骤的步骤 3。

## 3. 将混合物（每次小于 720 $\mu$ l，多可以分两次加入）加入一个基因组清除柱中，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. 将基因组 DNA 清除柱子放在一个干净 2ml 离心管内（不用 RNase free 或者 DEPC 处理，一般干净的新离心管即可。也可使用 RNA 吸附柱配套的新的干净收集管），在基因组清除柱内加 500 $\mu$ l 裂解液 RLT Plus，13,000 rpm 离心 30 秒，收集滤液（RNA 在滤液中），用微量移液器较精确估计滤过液体积（通常为 450-500 $\mu$ l 左右，滤过时候损失体积应该减去），加入 0.5 倍体积的无水乙醇，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。

## 5. 立刻将混合物(每次小于 720 $\mu$ 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>。

## 6. 加 700 $\mu$ l 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

## 7. 加入 500 $\mu$ 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 $\mu$ l 漂洗液 RW，重复一遍。

## 8. 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。

## 9. 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 $\mu$ l RNase-Free H<sub>2</sub>O（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。

## 10. 如果预期 RNA 产量>30 $\mu$ g，加 30-50 $\mu$ l RNase-Free H<sub>2</sub>O 重复步骤 9，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。