

目 录

简介-----	2
原理-----	2
试剂盒组成-----	3
保质期-----	5
准备工作-----	6
方案 1:常规植物组织总 RNA 小量抽提-----	7
方案 2:难提抽植物组织总 RNA 小量抽提-----	9
方案 3:常规植物组织总 RNA 中量抽提-----	11
方案 4:难提抽植物组织总 RNA 中量抽提-----	13
方案 5:常规植物组织总 RNA 大量抽提-----	15
方案 6:难提抽植物组织总 RNA 大量抽提-----	17
方案 7:常规植物组织总 RNA 高通量抽提-----	19
方案 8:难提抽植物组织总 RNA 高通量抽提-----	21
常见问题回答-----	23

版本: 2008-01

简介

植物和真菌样品含有大量的代谢物质，如多酚类物质、多糖类物质以及其它次生代谢物质。这些代谢物质常常会干扰到 RNA 的提取和下游的应用。HiPure Plant RNA Kits 采用硅胶柱纯化技术和特殊的溶液系统，适合于从各种植物或真菌样品中抽提高纯度的总 RNA。该方法得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR, Northern blot, poly-A+ 纯化，核酸保护和体外翻译等实验。提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 20-60 分钟。

参数	Mini Kit	Midi Kit	Maxi Kit	96 Kit
产品编号	R4151	R4152	R4153	R4154
样品类型	植物叶片，根，茎，果实等，真菌等样品			
组织用量	50-100mg	0.5-1g	2.5-5g	25-50mg
结合力	150µg	1mg	5mg	100µg
洗脱体积(µl)	30-100	150-400	500-2000	70-150

原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。DNA 过滤柱采用特殊的吸附膜，能高效选择性地吸附基因组 DNA，而不吸附 RNA。DNA 过滤柱可高效地去除基因组 DNA，减少的 DNA 污染。

HiPure Plant RNA Kits 基于硅胶柱纯化方式。植物样品在含高浓度异胍盐裂解液中匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。由于裂解液中含有变性剂，内源性或外源性的 RNASE 变性而失活，RNA 被保护起来。裂解液经离心去除不溶解的杂质，得到的上清液经 gDNA 过滤柱过滤去除基因组 DNA，得到的滤液加入乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，RNA 被吸附于柱子的膜上，而蛋白质和杂质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA 被 RNASE-Free Water 洗脱。

组 成

HiPure Plant RNA Mini Kit

产品编号	R4151-01	R4151-02	R4151-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer RL	8 ml	30 ml	150 ml
Buffer PRC1	8 ml	40 ml	200 ml
Buffer PRC2	8 ml	40 ml	200 ml
Buffer RW1	10 ml	40 ml	150 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	2 ml	10 ml	50 ml
说明书	1	1	1

HiPure Plant RNA Midi Kit

产品编号	R4152-01	R4152-02	R4152-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Midi Columns	2	10	50
gDNA Filter Midi Columns	2	10	50
15ml Collection Tubes	4	20	100
Buffer RL	10 ml	60 ml	250 ml
Buffer PRC1	10 ml	60 ml	250 ml
Buffer PRC2	10 ml	60 ml	250 ml
Buffer RW1	10 ml	40 ml	180 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	2 ml	10 ml	50 ml
说明书	1	1	1

*: **Buffer RW2** 使用前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇稀释。

组 成

HiPure Plant RNA Maxi Kit

产品编号	R4153-01	R4153-02	R4153-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure RNA Maxi Columns	2	10	50
gDNA Filter Maxi Columns	2	10	50
50ml Collection Tubes	4	20	100
Buffer RL	45 ml	220 ml	2 x 600 ml
Buffer PRC1	45 ml	220 ml	2 x 600 ml
Buffer PRC2	45 ml	220 ml	2 x 600 ml
Buffer RW1	25 ml	70 ml	600 ml
Buffer RW2	20 ml	2 x 50 ml	2 x 200 ml
RNase Free Water	10 ml	30 ml	100 ml
说明书	1	1	1

HiPure Plant RNA 96 Kit

产品编号	R4154-01	R4154-02	R4154-03
纯化次数	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
HiPure RNA Plate	1	4	20
gDNA Filter Plate	1	4	20
2ml Collection Plate	2	8	40
Buffer RL	60 ml	250 ml	2 x 600 ml
Buffer PRC1	60 ml	250 ml	2 x 600 ml
Buffer PRC2	60 ml	250 ml	2 x 600 ml
Buffer RW1	100 ml	350 ml	2 x 800 ml
Buffer RW2	50 ml	2 x 100 ml	4 x 200 ml
RNase Free Water	30 ml	100 ml	500 ml
说明书	1	1	1

*: **Buffer RW2** 使用前，须按瓶子标签指示加入无水乙醇稀释。

保 质 期

HiPure Plant RNA Kits 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下, Buffer RL 或 Buffer PRC1 可能会有沉淀形成, 55℃水浴让沉淀完全溶解后使用。

需要准备材料和工具

- **β-巯基乙醇(14.3M, β-ME)**: 一般市售的β-巯基乙醇都是**14.3M**。β-ME是RNase强烈变性剂, 需要添加至Buffer RL/PRC1, 以提高裂解液变性和抑制RNASE的能力。使用前, 分装适量的Buffer RL/PRC1, 按每1ml RL/PRC1 Buffer加入20μl β-巯基乙醇。RL/PRC1 Buffer/β-ME混合液可室温稳定放置1个星期。β-ME气味难闻, 毒性较强, 可用2 M DTT (Dithiothreitol)来代替β-ME。用RNase Free Water或灭菌水配制2M DTT, 然后分装保存于-20℃。按1ml RL/PRC1 Buffer加入10μl 2M DTT。该混合液可室温放置2天。
- 无水乙醇(96-100%)
- 合适大小的无 RNase 酶的离心管
- 无 RNase 酶的枪头
- 手套
- 研钵与研磨棒
- 液氮
- 水浴锅
- 按瓶子标签指示, 加入适量的无水乙醇稀释 **Buffer RW2**, 并于室温保存。

方案 1. 常规植物样品总 RNA 小量抽提(R4151)

该方案适合于从 $\leq 100\text{mg}$ 次生代谢物质较少的植物/真菌样品中提取高纯度的总 RNA，如水稻、玉米、黄豆、番茄、棉花、烟草等。富含多糖类植物样品，如蕃薯、香蕉、花生，以及富含多酚类的植物样品，如葡萄、菊科类、松针等，推荐使用方案 2。以下离心均在室温下进行。

1. 植物样品的研磨。

- 收集植物样品并尽快浸泡到液氮中以防止 RNA 的降解。使用研钵、研磨棒和液氮将植物样品研磨成尽量细小的粉末。RNA 的产量取决于样品类型和研磨效果。
注：研磨后的植物粉末可直接保持于 -70°C 。

- 快速称取 50-100mg 的研磨好的植物样品至 1.5ml 预冷的离心管中。

注：在加入裂解液之前，不要让样品解冻。初次使用时，推荐先使用 50mg，待取得理想结果后，再酌情提高用量。

- ### 2. 立即加入 500 μl Buffer RL/ β -ME 混合液至样品中。立即于最高速度涡旋 30-60 秒充分打散样品，室温静置 3-5 分钟让样品充分裂解。

注：使用前分装适量的 Buffer RL，每 1ml Buffer RL 加入 20 μl β -巯基乙醇(β -ME)或 2M DTT。若植物用量增加超过 100mg，按比例增加 Buffer RL/2-ME 的用量。

- ### 3. 室温下，14,000 x g 离心 5 分钟。

- ### 4. 把 gDNA 过滤柱装在 2ml 收集管中。把第三步的上清液转移至 gDNA 过滤柱中。14,000 x g 离心 1 分钟。

- ### 5. 弃去 gDNA 过滤柱。加入 0.5 倍体积无水乙醇($\sim 250\mu\text{l}$)至滤液中。用移液枪吸打 3-5 次混匀。

- ### 6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移第 5 步的混合液至 RNA 柱子中。10,000 x g 离心 30-60 秒。

- ### 7. (可选)这一步可插入 DNase 进行膜上消化。(请另外订购 DNase On Column Kit 进行膜上 DNase 消化)。

- ### 8. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。加入 500 μl Buffer RW1 至柱子中。10,000 x g 离心 30-60 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)** 至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。

注：在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。

10. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。加入 **600 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)** 至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。

11. 倒弃滤液，把柱子套回空的收集管。10,000 \times g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。

12. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 **30-50 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。

13. (可选)再加入 **30-50 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 2 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。

注：HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 30 μ l，小于 30 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 30 μ g，推荐按第 13 步进行第二次洗脱。

14. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 难提取植物样品总 RNA 小量抽提(R4151)

该方案适合于从 $\leq 100\text{mg}$ 各种植物样品和真菌样品, 包括多糖类和多酚类的植物样品中抽提高纯度的总 RNA。该方案已经成功地从如下植物样品中获得高纯度的 RNA。以下离心均在室温下进行。

- 多酚类样品如葡萄叶片、白松叶片、红背桂叶片、棉花、荔枝叶片等。
- 多糖类的样品, 如蕃薯叶片, 花生叶片、香蕉叶片等。

1. 植物样品的研磨

- 收集植物样品并尽快浸泡到液氮中以防止 RNA 的降解。使用研钵、研磨棒和液氮将植物样品研磨成尽量细小的粉末。RNA 的产量取决于样品类型和研磨效果。
注: 研磨后的植物粉末可直接保持于 -70°C 。

- 快速称取 50-100mg 的研磨好的植物样品至 1.5ml 预冷的离心管中。
在加入裂解液之前, 不要让样品解冻。初次使用时, 推荐先使用 50mg, 待取得理想结果后, 再酌情提高用量。

2. 立即加入 700 μl Buffer PRC1/ β -ME 混合液至样品中。立即于最高速度涡旋 30-60 秒充分打散样品。55 $^{\circ}\text{C}$ 短暂水浴 1-3 分钟。

使用前, 分装适量的 Buffer PRC1, 每 1ml Buffer PRC1 加入 20 μl β -巯基乙醇或 2M DTT。处理某些样品时, 如桉树叶片等, 加入 PVP-40 固体至 Buffer PRC1(终浓度为 2%), 溶解后再按此步操作有利于提高产量。

3. 14,000 x g 离心 5 分钟。

4. 把 gDNA 过滤柱装在 2ml 收集管中。把第三步的上清液转移至 gDNA 过滤柱中。14,000 x g 离心 2 分钟。

5. 弃去 gDNA 过滤柱。加入 0.5 倍或等倍体积 Buffer PRC2 至滤液中。用移液枪吸打 3-5 次混匀。

富含多糖类的样品, 建议加入 0.5 倍体符号 Buffer PRC2, 有些样品可能需加入等倍的 Buffer PRC2。

6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。10,000 x g 离心 30-60 秒。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。把剩余的混合液转移至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
8. (可选)这一步可插入 DNase 进行膜上消化。(请另外订购 DNase On Column Kit 进行膜上 DNase 消化)。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **500µl Buffer RW1** 至柱子上。10,000 × g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **600µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)** 至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
注：在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **600µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)** 至柱子中。10,000×g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心空柱 2 分钟甩干柱子。
13. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 **30-50µl RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
14. (可选)再加入 **30-50µl RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
注：HiPure RNA Mini Column 最小的洗脱体积是 30µl，小于 30µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 30µg，推荐按第 14 步进行第二次洗脱。
15. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

方案 3. 常规植物样品总 RNA 中量抽提(R4152)

该方案适合于从 $\leq 1\text{g}$ 次生代谢物质较少的植物或真菌样品中提取高纯度的总 RNA，如水稻、玉米、黄豆、番茄、棉花、烟草等。富含多糖类植物样品，如蕃薯、香蕉、花生，以及富含多酚类植物样品，如葡萄、菊科类、松针等，推荐使用方案 4。以下离心均在室温下进行。

1. 植物样品的研磨

- 收集植物样品并尽快浸泡到液氮中以防止 RNA 的降解。使用研钵、研磨棒和液氮将植物样品研磨成尽量细小的粉末。RNA 的产量取决于样品类型和研磨效果。
注：研磨后的植物粉末可直接保持于 -70°C 。
- 快速称取 0.5-1.0g 的研磨好的植物样品至 15ml 预冷的离心管中。
在加入裂解液之前，不要让样品解冻。初次使用时，推荐先使用 500mg 样品，待取得理想结果后，再酌情提高用量。

2. 立即加入 4.5ml Buffer RL/ β -ME 混合液至样品中。立即于最高速度涡旋 30-60 秒充分打散样品，室温静置 3-5 分钟让样品充分裂解。

使用前分装适量的 Buffer RL，每 1ml Buffer RL 加入 20 μl β -巯基乙醇(β -ME)或 2M DTT。若植物用量增加超过 100mg，按比例增加 Buffer RL/2-ME 的用量。

3. 4,000~5,000rpm 离心 15 分钟。

4. 把 gDNA Filter Midi Column 装在 15ml 收集管中。小心把第三步的上清液转移至 gDNA 过滤柱中。4,000~5,000rpm 离心 5 分钟。

5. 弃去 gDNA 过滤柱。加入 0.5 倍体积无水乙醇至滤液中。最高速度涡旋 30 秒混匀。

6. 把 HiPure RNA Midi Column 装在 15ml 收集管中。转移一半混合液(第 5 步)至 RNA 中量柱中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。把剩余的混合液转移至 RNA 中量柱中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。

8. (可选)这一步可插入 DNase 进行膜上消化。(请另外订购 DNase On Column Kit 进化膜上 DNase 消化)。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **3ml Buffer RW1** 至柱子上。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **4ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)**至柱子中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **4ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)**至柱子中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。4,000-5,000rpm 离心 10 分钟甩干柱子。
13. 将柱子转移至新的 15ml 离心管。加入 **300-400 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
14. **(可选)**再加入 **300-400 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：HiPure RNA Midi Column 最小的洗脱体积是 300 μ l，小于 300 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 100 μ g，推荐按第 14 步再加入 300-400 μ l DEPC 水至柱子中，进行第二次洗脱。
15. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 4. 难提取植物样品总 RNA 中量抽提 (R4152)

该方案适合于从 $\leq 1\text{g}$ 各种植物样品和真菌样品，包括多糖类和多酚类的植物样品中抽提高纯度的总 RNA。该方案已经成功地从如下植物样品中获得高纯度的 RNA。以下离心均在室温下进行。

- 多酚类样品如葡萄叶片、白松叶片、红背桂叶片、棉花、荔枝叶片等。
- 多糖类的样品，如蕃薯叶片，花生叶片、香蕉叶片等。

1. 植物样品的研磨

- 收集植物样品并尽快浸泡到液氮中以防止 RNA 的降解。使用研钵、研磨棒和液氮将植物样品研磨成尽量细小的粉末。RNA 的产量取决于样品类型和研磨效果。
注：研磨后的植物粉末可直接保持于 -70°C 。

- 快速称取 0.5-1.0g 的研磨好的植物样品至 15ml 预冷的离心管中。
注：在加入裂解液之前，不要让样品解冻。初次使用时，推荐先使用 500mg 样品，待取得理想结果后，再酌情提高用量。

2. 立即加入 4.5ml Buffer PRC1/ β -ME 混合液至样品中。立即于最高速度涡旋 30-60 秒充分打散样品。55 $^{\circ}\text{C}$ 短暂水浴 1-3 分钟。

注：使用前，分装适量的 Buffer PRC1，每 1ml Buffer PRC1 加入 20 μl β -巯基乙醇或 2M DTT。处理某些样品时，如桉树叶片等，加入 PVP-40 固体至 Buffer PRC1(终浓度为 2%)，溶解后再按此步操作有利于提高产量。

3. 4,000-5,000rpm 离心 15 分钟。

4. 把 gDNA Filter Midi Column 装在 15ml 收集管中。小心把第三步的上清液转移至 gDNA 过滤柱中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。

5. 弃去 gDNA 中量过滤柱。加入 0.5 倍或等倍体积 Buffer PRC2 至滤液中。最高速度涡旋 30 秒混匀。

富含多糖类的样品，建议加入 0.5 倍体符号 Buffer PRC2，有些样品可能需加入等倍的 Buffer PRC2。

6. 把 HiPure RNA Midi Column 装在 15ml 收集管中。转移一半混合液(第 5 步)至 RNA 中量柱中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。把剩余的混合液转移至 RNA 中量柱中。
4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
8. (可选)这一步可插入 DNase 进行膜上消化。(请另外订购 DNase On Column Kit 进行膜上 DNase 消化)。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **3ml Buffer RW1** 至柱子上。
4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **4ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)**至柱子中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **4ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)**至柱子中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。4,000-5,000rpm 离心 10 分钟甩干柱子。
13. 将柱子转移至新的 15ml 离心管。加入 **300-400 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
14. (可选)再加入 **300-400 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：HiPure RNA Midi Column 最小的洗脱体积是 300 μ l，小于 300 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 100 μ g，推荐按第 14 步再加入 300-400 μ l DEPC 水至柱子中，进行第二次洗脱。
15. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 5. 常规植物样品总 RNA 大量抽提 (R4153)

该方案适合于从≤5g 次生代谢物质较少的植物或真菌样品中提取高纯度的总 RNA，如水稻、玉米、黄豆、番茄、棉花、烟草等。富含多糖类植物样品，如蕃薯、香蕉、花生，以及富含多酚类植物样品，如葡萄、菊科类、松针等，推荐使用方案 4。以下离心均在室温下进行。

1. 植物样品的研磨

- 收集植物样品并尽快浸泡到液氮中以防止 RNA 的降解。使用研钵、研磨棒和液氮将植物样品研磨成尽量细小的粉末。RNA 的产量取决于样品类型和研磨效果。
注：研磨后的植物粉末可直接保持于-70°C。
- 快速称取 2-5g 的研磨好的植物样品至 50ml 预冷的离心管中。
注：在加入裂解液之前，不要让样品解冻。初次使用时，推荐先使用 2g 样品，待取得理想结果后，再酌情提高用量。

2. 立即加入 20ml Buffer RL/ β -ME 混合液至样品中。立即于最高速度涡旋 30-60 秒充分打散样品，室温静置 3-5 分钟让样品充分裂解。

注：使用前分装适量的 Buffer RL，每 1ml Buffer RL 加入 20 μ l β -巯基乙醇(β -ME)或 2M DTT。若植物用量增加超过 100mg，按比例增加 Buffer RL/2-ME 的用量。

3. 4,000-5,000rpm 离心 15 分钟。

4. 把 gDNA 大量过滤柱装在 50ml 收集管中。小心把第三步的上清液转移至 gDNA 柱子中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。

5. 弃去 gDNA 过滤柱。加入 0.5 倍体积无水乙醇至滤液中。涡旋 30 秒混匀。

6. 把 HiPure RNA Maxi Column 装在 50ml 收集管中。转移一半体积的混合液至 RNA 大量柱子中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。把剩余的混合液转移至 RNA 大量柱中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。

8. (可选)这一步可插入 DNase 进行膜上消化。(请另外订购 DNase On Column Kit 进化膜上 DNase 消化)。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **10ml Buffer RW1** 至柱子上。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **15ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)**至柱子中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **15ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)**至柱子中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。4,000-5,000rpm 离心 15 分钟甩干柱子。
13. 将柱子转移至新的 15ml 离心管。加入 **700 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
14. 再加入 **700 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：HiPure RNA Maxi Column 最小的洗脱体积是 700 μ l，小于 700 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 1mg，推荐按第 14 步再加入 700 μ l DEPC 水至柱子中，进行第二次洗脱。
15. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 6. 难提取植物样品总 RNA 大量抽提 (R4153)

该方案适合于从≤5g 各种植物样品和真菌样品，包括多糖类和多酚类的植物样品中抽提高纯度的总 RNA。该方案已经成功地从如下植物样品中获得高纯度的 RNA。以下离心均在室温下进行。

- 多酚类样品如葡萄叶片、白松叶片、红背桂叶片、棉花、荔枝叶片等。
- 多糖类的样品，如蕃薯叶片，花生叶片、香蕉叶片等。

1. 植物样品的研磨

- 收集植物样品并尽快浸泡到液氮中以防止 RNA 的降解。使用研钵、研磨棒和液氮将植物样品研磨成尽量细小的粉末。RNA 的产量取决于样品类型和研磨效果。
注：研磨后的植物粉末可直接保持于-70°C。

- 快速称取 2-5g 的研磨好的植物样品至 50ml 预冷的离心管中。

注：在加入裂解液之前，不要让样品解冻。初次使用时，推荐先使用 2g 样品，待取得理想结果后，再酌情提高用量。

2. 立即加入 **20ml Buffer PRC1/β-ME 混合液至样品中**。立即于最高速度涡旋 30-60 秒充分打散样品。55°C 短暂水浴 1-3 分钟。

注：使用前，分装适量的 Buffer PRC1，每 1ml Buffer PRC1 加入 20μl β-巯基乙醇或 2M DTT。处理某些样品时，如桉树叶片等，加入 PVP-40 固体至 Buffer PRC1(终浓度为 2%)，溶解后再按此步操作有利于提高产量。

3. 4,000-5,000rpm 离心 15 分钟。

4. 把 gDNA Filter Maxi Column 装在 50ml 收集管中。小心把第三步的上清液转移至 **gDNA 过滤柱**中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。

5. 弃去 gDNA 柱子。加入 **0.5 或 1 倍体积 Buffer PRC2 至滤液**中，最高速度涡旋 30 秒混匀。

富含多糖类的样品，建议加入 0.5 倍体符号 Buffer PRC2，有些样品可能需加入等倍的 Buffer PRC2。

6. 把 HiPure RNA Maxi Column 装在 50ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至 RNA 大量柱子**中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。把剩余的混合液转移至 RNA 大量柱中。
4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
8. (可选)这一步可插入 DNase 进行膜上消化。(请另外订购 DNase On Column Kit 进行膜上 DNase 消化)。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **10ml Buffer RW1** 至柱子上。
4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **15ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)**至柱子中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 **15ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)**至柱子中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。4,000-5,000rpm 离心 15 分钟甩干柱子。
13. 将柱子转移至新的 15ml 离心管。加入 **700 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
14. 再加入 **700 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。
4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：HiPure RNA Maxi Column 最小的洗脱体积是 700 μ l，小于 700 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 1mg，推荐按第 14 步再加入 700 μ l DEPC 水至柱子中，进行第二次洗脱。
15. 弃去柱子，把 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C。

方案 7. 常规植物样品总 RNA 高通量抽提(R4154)

该方案采用 96 孔 RNA 结合板和 gDNA 过滤板，可高通量从 96 个≤50mg 次生代谢物质较少的植物/真菌样品中提取高纯度的总 RNA，如水稻、玉米、黄豆、番茄、棉花、烟草等。富含多糖类植物样品或真菌样品，如蕃薯、香蕉、花生，以及富含多酚类的植物样品，如葡萄、菊科类、松针等，推荐使用方案 8。以下离心均在室温下进行。

1. **样品的高通量研磨**：剪取 50mg 植物或真菌样品至 96 孔板中，然后采用合适的高通量珠磨仪如 Gene Grinder 2010, Tissue Lyser 等进行研磨。
2. **立即加入 500µl Buffer RL/2-ME 混合液至样品中**。高速涡旋 60 秒打散样品。室温静置 5-10 分钟，其间涡旋混匀一次。
注：使用前，分装适量的 Buffer RL，每 1ml Buffer RL 加入 20µl β-巯基乙醇或 2M DTT。若植物用量增加，Buffer RL/2-ME 的用量也必须相应地增加。
3. 4,000-5,000rpm 离心 15 分钟。
4. 把 gDNA Filter Plate 装在 2ml 收集板中。**小心把第三步的上清液转移至 gDNA 过滤板中**。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
5. 弃去 gDNA 结合板。**加入 0.5 倍体积无水乙醇至滤液中**，用移液枪吸打 3-5 次混匀或振荡混匀 60 秒。
6. 把 HiPure RNA Plate 装在 2ml 收集板中。**转移第五步的混合液至 RNA 板中**。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
7. (可选)这一步可插入 DNase 进行膜上消化。(请另外订购 DNase On Column Kit 进行膜上 DNase 消化)。
8. 倒弃滤液，把结合板装在收集板中。**加入 700µl Buffer RW1 至结合板中**。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
9. 倒弃滤液，把结合板装在收集板中。**加入 700µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至结合板中**。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。
10. 倒弃滤液，把结合板装在收集板中。**加入 700µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)**

至结合板中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。

11. 倒弃滤液，把结合板装在收集板中。4,000-5,000rpm 离心 15 分钟。
12. 将结合板装在 0.5ml 96 孔板中。加入 **75-100 μ l RNase Free Water** 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：HiPure RNA Plate 最小的洗脱体积是 70 μ l，小于 70 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 30 μ g，推荐再加入 50 μ l RNase Free Water 至柱子中，进行第二次洗脱。
13. 弃去结合板，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 8. 难提取植物样品总 RNA 小量抽提(R4154)

该方案采用 96 孔 RNA 结合板和 gDNA 过滤板，可高通量从 96 个≤50mg 多糖类和多酚类的植物样品中抽提高纯度的总 RNA。该方案已经成功地从如下植物样品中获得高纯度的 RNA。以下离心均在室温下进行。

- 多酚类样品如葡萄叶片、白松叶片、红背桂叶片、棉花、荔枝叶片等。
 - 多糖类的样品，如蕃薯叶片，花生叶片、香蕉叶片等。
1. **样品的高通量研磨**：剪取 50mg 植物或真菌样品至 96 孔板中，然后采用合适的高通量珠磨仪如 Gene Grinder 2010, Tissue Lyser 等进行研磨。
 2. **立即加入 500µl Buffer PRC1/β-ME 混合液至样品中**。高速涡旋 60 秒打散样品。55°C 短暂水浴 1-3 分钟。
注：使用前，分装适量的 Buffer PRC1，每 1ml Buffer PRC1 加入 20µl β-巯基乙醇或 2M DTT。处理某些样品时，如桉树叶片等，加入 PVP-40 固体至 Buffer PRC1(终浓度为 2%)，溶解后再按此步操作有利于提高产量。
 3. 4,000-5,000rpm 离心 15 分钟。
 4. 把 gDNA Filter Plate 装在 2ml 收集板中。**小心把第三步的上清液转移至 gDNA 过滤板中**。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
 5. 弃去 gDNA 结合板。**加入 0.5 倍体积 Buffer PRC2 至滤液中**，用移液枪吸打 3-5 次混匀或振荡混匀 60 秒。
 6. 把 HiPure RNA Plate 装在 2ml 收集板中。**转移第五步的混合液至 RNA 板中**。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
 7. (可选)这一步可插入 DNase 进行膜上消化。(请另外订购 DNase On Column Kit 进行膜上 DNase 消化)。
 8. 倒弃滤液，把结合板装在收集板中。**加入 700µl Buffer RW1 至结合板中**。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
 9. 倒弃滤液，把结合板装在收集板中。**加入 700µl Buffer RW2(已用乙醇稀释) 至结合板中**。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签指示用无水乙醇进行稀释。

10. 倒弃滤液，把结合板装在收集板中。加入 **700μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)** 至结合板中。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
11. 倒弃滤液，把结合板装在收集板中。4,000-5,000rpm 离心 15 分钟。
12. 将结合板装在 0.5ml 96 孔板中。加入 **75-100μl RNase Free Water** 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。4,000-5,000rpm 离心 5 分钟。
注：HiPure RNA Plate 最小的洗脱体积是 70μl，小于 70μl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。如果 RNA 产量超过 30μg，推荐再加入 50μl RNase Free Water 至柱子中，进行第二次洗脱。
13. 弃去结合板，把 RNA 保存于-80℃。

常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员可以随时为您提供咨询服务。若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
柱子堵塞	
样品用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件，初次使用时，推荐只用一半的样品，然后根据结果调整样品的用量。
样品富含多糖类	样品富含多糖类物质，导致裂解液变得非常粘稠，减少样品的用量或加入裂解液的用量。
低温离心	试剂盒中除特别指明，所有的离心操作都必须在室温（20-25°C）。离心条件低于 20°C 时，可能会导致沉淀的形成而引起柱子堵塞。设定离心机的温度为（20-25°C）。
RNA 产量低	
样品不充分匀浆	加入裂解液 Buffer RL 或 Buffer PRC1 后，要立即涡旋充分打散样品。
样品用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。
洗脱效率低	洗脱时，RNase Free Water 体积太少或没有加到膜上。增加洗脱液的体积或增加洗脱次数
Buffer RW2 没有加入乙醇稀释	使用前，Buffer RW2 须加入 4 倍体积的无水乙醇稀释，或按瓶子标签指示进行稀释。
无水乙醇或 Buffer PRC2 加入的体积不对	在过 RNA 柱子前，须加入 0.5 倍体积的无水乙醇或等体积 Buffer PRC2 至滤液中，混匀后，再过 RNA 柱。
RNA 降解	
操作不规范	液氮研磨后，在加入裂解液之前，不要让样品解冻

样品用量太多 减少样品用量。

RNA 酶污染 操作过程可能引入 RNA 酶的污染

DNA 污染

样品用量太多 样品用量太多，超过 gDNA 柱的结合能力。

膜上 DNase 消化 该产品携带的 gDNA 柱可高效地去除基因组 DNA。但对灵敏的 RT-PCR 应用，推荐另订购 DNase Column Kit 进行膜上 DNase 消化，以彻底去除基因组 DNA 的污染。

下游实验结果不理想

盐分污染 加入 Buffer RW2 后，静置 3 分钟后，再离心，

乙醇污染 确保按照说明书中的条件空甩柱子

膜材料脱落 硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。