

目 录

简 介	2
原 理	2
保质期	2
试剂盒组成	3
准备工作	3
方案 1:植物小分子总 RNA 抽提	4
方案 2:植物总 RNA(含小分子 RNA)抽提	6
常见问题回答	8

版本: 2018-01

简介

植物样品含有大量的代谢物质。一些植物样品含有丰富的多酚类或多糖类的物质。这些代谢物质常常会干扰到 RNA 的提取和下游的应用。这类植物 RNA 提取的传统的方法中常常用到有机物抽提等耗时、效率低的步骤。而 HiPure Plant miRNA Kit 则采用硅胶柱纯化技术和特殊的溶液系统,适合于从各种植物样品中抽提高纯度的小分子 RNA。该方案操作过程无需接触酚氯仿抽提。得到的小分子 RNA 可直接用于芯片分析、Northern 杂交、RT-PCR 等。此外,该方法也可以得到总 RNA,以满足用户的不同要求。该产品可用于常规植物(黄豆,玉米,水稻,小麦),多酚类植物(桉树,荔枝,榕树,桃树,松树),以及多糖类植物(香蕉,番薯,花生,芦荟)等高纯度的小分子 RNA 抽提或总 RNA 抽提。

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。

HiPure Plant miRNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。植物样品在含高浓度胍盐裂解液中匀浆裂解,RNA 释放到裂解液中。由于裂解液中含有高浓度胍盐,内源性或外源性的 RNASE 变性失活,RNA 被保护起来。加入沉淀剂至裂解液中,离心去除不溶解的大分子 RNA 和基因组 DNA 等杂质,加入乙醇调节结合条件,混合液转移至柱子中过滤,miRNA 被吸附上柱子的膜上。柱子经洗涤液去除蛋白质和其它杂质,经 Buffer RW2 洗涤去除盐分,最后 RNA 被 RNase-Free Water 洗脱。洗脱的 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。

保质期

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

组 成

HiPure Plant miRNA Kit

产品编号	R4312-01	R4312-02	R4312-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
gDNA Filter Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer PRM	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer PRC2	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 2-mercaptoethanol
- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积的无水乙醇，于室温保存。
- 在 Buffer RWC 中，加入 2 倍体积的无水乙醇，于室温保存。

方案 1. 植物组织小分子 RNA 抽提

该方案适合于从各种植物样品，包括多糖类和多酚类的植物样品中抽提高纯度的小分子 RNA (<200nt)。以下离心条件均在室温下进行。

1. 按下表配制 Lysis Mixture:

组分	总体积 (~1ml)
Buffer PRM	650 μ l
Buffer PRC2	300 μ l
Absolute ethanol	50 μ l
2-mercaptoethanol	10 μ l

省略无水乙醇有利于提高某些样品的小分子 RNA 的产量，但省略无水乙醇有可能会引起少量的基因组 DNA 污染。省略无水乙醇时，Buffer PRM 体积调整为 700 μ l。

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。
 - 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。
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。在加入裂解液之前，不要让样品解冻。
2. **立即加入 700 μ l Lysis Mixture 至样品中。** 最高速度涡旋 30 秒打散样品。55 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟，其间不要涡旋混匀。
 3. 室温，14,000 \times g 离心 5 分钟。
 4. 把 gDNA Filter column 装在 2ml 收集管中。**转移上清液至过滤柱中。** 14,000 \times g 离心 2 分钟。
若上清液表面有漂浮物，转移上清液尽量不要转移这些漂浮物，以减少堵柱的现象。
 5. 丢弃 gDNA 过滤柱。**加入 1.1 倍体积无水乙醇至滤液中，用移液枪吸打混匀 5 次。**
 6. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移 700 μ l 混合液至柱子中。**

10,000 × g 离心 30-60 秒。

7. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。转移剩余的混合液至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500µl Buffer RWC 至柱子中。**10,000 × g 离心 30-60 秒。
在使用 Buffer RWC 之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)**，10,000 × g 离心 30-60 秒。
在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签所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 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)**，10,000 × g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子套回空的收集管。13,000 × g 离心空柱 2 分钟，以甩干柱子的基质。
12. **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。**室温静置 2 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
13. 丢弃柱子，把 RNA 保存于-80C。

方案 2. 植物组织总 RNA 抽提

该方案适合于从各种植物样品，包括多糖类和多酚类的植物样品中抽提高纯度的总 RNA，包括大分子和小分子 RNA。以下离心条件均在室温下进行。

1. 按下表配制 lysis Mixture:

组分	总体积: ~1ml
Buffer PRM	1000 μ l
2-mercaptoethanol	20 μ l

2. 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。
 - 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。
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。在加入裂解液之前，不要让样品解冻。
3. **立即加入 700 μ l lysis Mixture 至样品中。** 最高速度涡旋 30 秒打散样品。55 $^{\circ}$ C 短暂水浴 3 分钟。
若样品富含淀粉类物质时，增加 lysis Mixture 体积至 1ml，因为淀粉会吸附大量的水分，并用室温静置代替 55 $^{\circ}$ C。
4. 室温，14,000 x g 离心 5 分钟。
5. **把 gDNA Filter column 装在 2ml 收集管中。小心转移 600 μ l 上清液至过滤柱中。** 14,000 x g 离心 2 分钟。
6. 丢弃 gDNA 过滤柱。**加入 1.5 倍无水乙醇至滤液中**，用移液枪吸打混匀 5 次。
7. 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。
8. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。转移剩余的混合液至柱子中。10,000 x g 离心 30-60 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子中。**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
在使用 Buffer RWC 之前，必须按瓶子标签所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 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)，**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
注：在使用 Buffer RW2 之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
11. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)，**10,000 \times g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子套回空的收集管。13,000 \times g 离心空柱 2 分钟，以甩干柱子的基质。
13. **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。**室温静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 丢弃柱子，把 RNA 保存于-80C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也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	
样品起始用量太多	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，如处理多糖类的样品必须减少用量。
上清液不澄清	沉淀中含有细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些组织样品时，离心后裂解液表面还可能会有一层脂类层，转移上清液尽量不要吸到这些物质。
RNA 产量低	
样品不充分匀浆	参照上面
样品的起始用量太多	参照上面
RNA 降解	
组织或细胞用量太多	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。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染。
DNA 污染	
没有进行 DNase I 消化	不要省略 DNASE I 膜上消化步骤，确保 DNase I 消化液全部加到膜中央。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000xg，离心时间为 2 分钟。
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。