

Imagene®

GenePure Plus Plantcomplex RNA Kit GenePure Plus 复杂植物 RNA 快速提取试剂盒

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CODONX

RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

GenePure Plus 复杂植物 RNA 快速提取试 目录号 RE122

使用说明书

网站: www.codonx.com
 咨询电话: 010-56315162
 技术支持 QQ: 3090544158

- 1/适用范围
- 2/试剂盒组成、储存、稳定性
- 3/储存事项
- 4/产品介绍
- 5/产品特点
- 6/注意事项
- 7/操作步骤
- 8/附录

1/适用范围:

适用于快速提取复杂植物组织细胞总RNA，使用独有基因组DNA清除柱技术可有效清除电泳可见gDNA残留，RNA可用于反转录PCR，荧光定量PCR等。

2/试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50次(RE122-01)
裂解液 CLB	室温	50 ml
裂解液 LBT Plus	室温	25 ml
去蛋白液 PRS	室温	40 ml
漂洗液 RB	室温	10 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
基因组 DNA 清除柱 CC 和收集管 CT	室温	50套
RNase-free 吸附柱 AC 和收集管 CT	室温	50套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

3/储存事项:

1. 不合适的储存于低温（4℃或者-20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃-25℃）进行。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

4/产品介绍:

本公司在独家推出 GenePure 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，又独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化，可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。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。

5/产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚, 氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 简捷, 单个样品操作一般可在 25 分钟内完成, 世界上最简单快速的试剂盒。
3. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留, 得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化, 可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 适应性极其广泛, 可以提取包括复杂中草药、复杂淀粉种子、复杂果实、复杂抗逆植物、复杂花卉、复杂多糖植物等数百种国内外试剂盒提取失败的样品。
5. 多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.9~2.2, 基本无 DNA 残留, 可用于 RT-PCR, Northern-blot, 二代测序和各种实验。

6/注意事项

1. **所有的离心步骤均可在室温完成(4℃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β-巯基乙醇, 乙醇, 研钵(可选)。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱CC和和RNA吸附柱AC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。
4. 裂解液CLB和LBT Plus 和去蛋白液PRS中含有刺激性化合物, 操作时戴乳胶手套, **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。**
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 (DNase 消化也无法做到 100%无残留), 本公司的 GenePure Plus RNA 提取产品, 由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术, 绝大多数 DNA 已经被清除, 不需要 DNase 消化, 可直接用于反转录 PCR 和荧光定量 PCR。个别特殊情况如 DNA 含量过于丰富造成残留或者要进行严格的 mRNA 表达量分析荧光定量 PCR, 我们建议在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PRS漂洗前，直接在吸附柱AC上进行DNase I柱上消化处理。购买DNA酶柱上消化试剂盒(货号：RE128)前可先索取具体操作说明书。

7/操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RB 瓶加入指定量无水乙醇!
- ⇒ 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% β-巯基乙醇（1ml CLB 加 50μl β-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（水分少的样品如叶片种子等可加 100-150mg，水分多的样品如草莓西瓜果实可多加一些）迅速剪成小块放入研钵，加入 1ml CLB（已加有β-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。

β-巯基乙醇是裂解液 CLB 的关键成分，必要的时候可以提高终浓度到 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 CC 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（水分少的样品如叶片种子等可加 100-150mg，水分多的样品如草莓西瓜果实可多加一些）加至预热的裂解液 CLB（已加有β-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 CC 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 μ l，多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱 CC 中，(清除柱 CC 放入收集管 CT 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 CC 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 CT)，在基因组清除柱 CC 内加 500 μ l 裂解液 LBT 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 μ 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 μ l，多可以分两次加入)加入一个吸附柱 AC 中，(吸附柱 AC 放入收集管 CT 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 μ l 去蛋白液 PRS，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
7. 加入 500 μ l 漂洗液 RB (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 RB，重复一遍。
8. 将吸附柱 AC 放回空收集管 CT 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 AC，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 water (事先在 70-90 $^{\circ}$ 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 μ g，加 30-50 μ l RNase free water 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。

8/附录: RNA 含量少样品或者 RNA 复杂产量低的解决方案

可以提高样品处理量到 300-500mg/2ml 裂解液 CLB, 上清过两根基因组 DNA 清除柱 CC, 洗脱下来的 RNA, 可以两个合并到一根 RNA 吸附柱上, 可以大大提高 RNA 浓度。

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com

