

一般实验室使用，仅用于 *体外*

# 通用植物总RNA大量提取试剂盒 (离心柱型)

用于快速提取各种动植物细胞/组织基因组和RNA

目录号: **RP3311 (5次)**    **RP3312 (10次)**

*使用手册*

2008年11月, 第1版



**北京百泰克生物技术有限公司**  
BioTeke Corporation

---

地 址: 北京海淀区留学人员创业园

电 话: 010-62951781

传 真: 010-62951781

网 址: [www.bioteke.com](http://www.bioteke.com)

Email: [info@bioteke.com](mailto:info@bioteke.com)



**北京百泰克生物技术有限公司**

BioTeke Corporation

---

# 目 录

|                     |   |
|---------------------|---|
| 一、试剂盒组成、储存、稳定性..... | 1 |
| 二、原理简介.....         | 2 |
| 三、试剂盒特点.....        | 2 |
| 四、注意事项.....         | 2 |
| 五、操作步骤.....         | 4 |
| 六、疑难解答.....         | 6 |

## 一、试剂盒组成、储存、稳定性

| 试剂盒组成                       | 保存             | 5 次 (RP3311)                       | 10 次 (RP3312)                   |
|-----------------------------|----------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 裂解液 PL                      | 室温 (-20℃长期)    | 55 ml                              | 110 ml                          |
| 去蛋白液 RE                     | 室温             | 50ml                               | 100ml                           |
| 漂洗液 RW                      | 4℃一个月 (-20℃长期) | 25ml                               | 25ml*2                          |
|                             |                | <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>             |                                 |
| RNase-free H <sub>2</sub> O | 室温             | 10ml                               | 20ml                            |
| 70% 乙醇                      | 室温             | 22.5ml RNase-free H <sub>2</sub> O | 45mlRNase-free H <sub>2</sub> O |
|                             |                | <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>             |                                 |
| RNase-free 过滤柱              | 室温             | 5 个                                | 10 个                            |
| RNase-free 吸附柱 RA           | 室温             | 5 个                                | 10 个                            |
| 收集管 (50ml)                  | 室温             | 10 个                               | 20 个                            |

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

### 注意事项

1. 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
2. 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
3. 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。
4. 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。

## 二、原理简介

本产品是 BioTeke 自主开发的独特产品,其原理完全不同于异硫氰酸胍/酚/氯仿提取方法,克服了后者不能区分 RNA(本质上是多糖)和其他植物多糖的缺点,能高效将 RNA 和其他植物多糖分开,同时还能有效去除多酚和其他植物次级代谢成份,适合于绝大部分用 TRIZOL 和 QIAGEN Rneasy mini kit 无法提取的植物,并在近一百多种各类植物(包括十分棘手的松柏类植物)中得到验证。本产品还可以用于富含粘性糖蛋白的动物组织。

## 三、试剂盒特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜,柱与柱之间吸附量差异极小,可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 稳定性好、纯度高、方便快捷的优点,不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程, RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 多次漂洗去蛋白过程,提取 RNA 纯度更高。

## 四、注意事项(实验前必须首先阅读这部分!)

1. 为防止RNA降解,所有离心步骤如未加说明,均在4℃低温进行。使用转速可以达到10,000 rpm的传统台式离心机。
2. 裂解液 PL 和去蛋白液 RE 中含有刺激性有害化合物,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。
3. 预防 RNase 污染,在实际的操作中应遵循以下指南(参见《分子

克隆》)

- \* 全程佩戴一次性手套。皮肤经常带有细菌和霉菌,可能污染RNA的抽提并成为 RNA 酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。
  - \* 使用灭菌的、一次性的塑料器皿和自动吸管抽提RNA,避免使用公共仪器所导致的RNA酶交叉污染。
  - \* 使用无 RNA 酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在 150℃ 的烘箱中烘烤 4 小时,塑料器皿可以在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟,用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。
4. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析 RNA 的质量。好的 RNA 产物在电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体 RNA 带,分别为~5Kb (28S), ~2Kb (18S), 条带亮度比值约为 2: 1。有时候也可以看到~0.1kb 和 0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到 4, 5 条带也属于正常现象,如果 RNA 未成熟的前体或者不均一核 RNA、小核 RNA 提取出来也可能看到介于 7Kb 和 15Kb 之间的不连续的高分子量条带。
  5. 检测 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 吸光度比值时, RNA 样品应该溶于 TE 后检测,如果用水稀释后检测,由于一般水离子强度和 PH 值低,会使 OD<sub>280</sub> 升高,从而使比值降低。

## 五、操作步骤

\* 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇!事先将裂解液 PL 65℃ 预热,使用前加入 β-巯基乙醇到终浓度 0.2%。

1. 匀浆处理  
取1~2g植物组织于液氮中研磨,时间要短,要保持研钵中有液氮。组织样品容积不能超过PL容积的10%)。
2. 转移样品至已事先加入 10ml 裂解液 PL 的 50ml RNase free 离心管中,涡旋振荡混匀,避免有团块存在,在 65℃ 条件下孵育 10 分钟以使核

蛋白体完全分解，期间颠倒混匀几次。

3. 室温 (15-20 °C) 条件下 10,000rpm 离心 10 分钟，小心取上清转入一个新的 RNase free 过滤柱中(若上清表面有漂浮物，用枪头挑开吸取下面液体即可)。
4. 室温 8,000rpm 离心 60 秒。收集下滤液(含有总 RNA)于收集管中，进行下一步操作。
5. 在收集管中加入 1 倍体积 70%乙醇(请先检查是否已加入无水乙醇!)，上下颠倒混匀 (在富含淀粉或者多糖的样品中会出现混匀后溶液浑浊现象，此时过柱会出现堵柱情况，请在混匀后先 8,000rpm 离心 60 秒，取上清液转入吸附柱 RA 中)。将得到的溶液转入吸附柱 RA 中 (吸附柱套在收集管内,柱容 10ml)，溶液太多可以分次过柱。
6. 4 °C 10,000rpm 离心 60 秒，弃掉废液，将吸附柱重新套回收集管。
7. 加 10ml 去蛋白液 RE，4 °C 10,000rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
8. 加入 10ml 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇!)，4 °C 10,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
9. 加入 10ml 漂洗液 RW，4 °C 10,000 rpm 离心 60 秒，弃掉废液。
10. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，4 °C 10,000 rpm 离心 3 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。**
11. 取出吸附柱 RA，放入一个新的 50ml RNase free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 500-1000µl RNase free water(事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好)，室温放置 3 分钟，10,000 rpm 离心 3 分钟。如果需要更多的 RNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心 3 分钟,或者另外再加 500µl RNase free water，离心 1 分钟，合并两次洗脱液。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 RNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于 500µl，体积过小降低 RNA 洗脱效率，减少 RNA 产量。

12. DNA 去除，请参考相关说明书。以 Promega RQ1 RNase-Free Dnase 为例。在 2ml RNase free 离心管加入下列溶液

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| RQ1 RNase-Free DNase         | 50µl  |
| RQ1 DNase 10×Reaction Buffer | 50µl  |
| RNA                          | 400µl |

- a. 37°C 反应 30 分钟。
- b. 加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 涡旋混匀。室温，10,000 rpm 5 min 离心，取上清。
- c. 加入 50 µl 3 M 醋酸钠，1250 µl 冷乙醇，冰上放置 10 min。
- d. 4°C，10,000 rpm 15 min 离心，弃上清。
- e. 加入 70%冷乙醇洗净，4°C，10,000 rpm 5 min 离心，弃上清。
- f. 沉淀干燥。
- g. 用适量的 RNase Free dH2O 溶解后，进行 Agarose 电泳检测

## 六、疑难解答 (Trouble shooting)

见后页表格

| 出现的问题  | 可能的原因  | 建议解决方法   |
|--|--|--|
| 产量低  | 样品裂解或者匀浆不彻底  | 液氮研磨的时候尽量研磨完全，加入裂解液 PL 后剧烈震荡或者用枪头吹打帮助裂解。匀浆步骤可以提高产量。新鲜组织或者植物组织可以不需液氮，直接在干净研钵内加入适量裂解液 PL 直接研磨。 |
|  | 使用的样品或者裂解物在 -20℃或者-70℃存放太久   | 存放时间过长可能降低 RNA 产量，应尽快的处理样品或者裂解物。   |
|  | 组织本身含 RNA 少  | 不同类型的组织和细胞含有不同量的 RNA,对于含量少的组织应该适当提高起始处理量。  |
|  | 超过了吸附柱的最大吸附能力  | 同一个样品使用多个吸附柱，然后合并得到 RNA。   |
|  | 漂洗液 RW 内忘记加乙醇  | <b>第一次实验时，漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇。</b>  |
| OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub> 吸光度比值<1.6 | 分光光度计检测吸光度时，RNA 样品不是溶于 TE，而是溶于水。低离子浓度和低 pH 条件下，OD <sub>280</sub> 值会较高，造成比值低。 | 检测时用 TE 稀释样品   |

## 接前表

| 出现的问题          | 可能的原因  | 建议解决方法                                       |
|----------------|--|--|
|                | 污染了蛋白或者苯酚  |  |
| RNA降解，完整性不佳    | RNA 提取所用各种物品和试剂没有灭活 RNA 酶                                    | 按照注意事项准备 RNA 提取的各种用品。                        |
|                | 组织取出后没有马上处理或冷冻，提取前已经降解                                       | 组织应该尽量立刻处理，不能及时处理的应该尽快保存于 RNAfixer、液氮或者-70℃。 |
|                | 提取的 RNA 样品没有保存在-20℃或-70℃低温                                   | 尽可能的将 RNA 保存在-70℃的低温。                        |
|                | 样品提取过程中降解  | 提取动作应该尽可能的快，离心应该低温进行，取用 RNA 时尽量冰上进行。         |
| 下游的RT-PCR实验不成功 | 忘记做步骤 10，或者将吸附柱取出时下端碰到了收集管里面的漂洗液，造成洗脱下来的 RNA 含有乙醇，乙醇抑制了逆转录反应 | 确保做了步骤 10，然后小心取出吸附柱，可以在空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。      |

