

版本号: DP240829

Magnetic Hi-Plant RNA Kit

(Polysaccharides&Polyphenolics-rich)

磁珠法高效多糖多酚植物总RNA提取试剂盒

目录号: DP772

产品内容

产品组成		DP772 (96 preps)
DP 772	裂解液TSP (Buffer TSP)	100 ml
	蛋白酶K (Proteinase K)	2×1 ml
	核酸保护剂ST (Buffer ST)	5×1 ml
	结合增强剂ICBP (Buffer ICBP)	25 ml
	磁珠悬浮液BE (100 mg/ml) (MagAttract Suspension BE (100 mg/ml))	2×1 ml
	缓冲液RDC (Buffer RDC)	90 ml
	缓冲液SGBP (Buffer SGBP)	180 ml
	漂洗液RW4 (Buffer RW4)	90 ml
	漂洗液RW (Buffer RW)	20 ml
	无RNA酶双蒸水 (RNase-Free ddH ₂ O)	30 ml
RT431	RNase-Free DNase I (1500 U)	1 支
	无RNA酶双蒸水 (RNase-Free ddH ₂ O)	1 ml

备注: DP 772和RT431组分独立运输和储存。

储存条件

该试剂盒所有组分置于室温 (15-30℃) 干燥条件下, 可保存15个月。RNase-Free DNase I, RNase-Free ddH₂O置于2-8℃, 可保存15个月。

产品简介

本试剂盒可从植物组织，特别是富含多糖多酚或淀粉的植物组织（如棉花叶片，成熟水稻叶片，拟南芥种子，白松松针，香蕉，枇杷叶片，马铃薯块茎，苹果，梨，西瓜果肉，猕猴桃，月季，烟草，沙棘，百合等）中提取总RNA，可同时处理大量不同样品。提取的总RNA纯度高，基本没有基因组、蛋白和其它杂质的污染，可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA筛选、体外翻译、RNase保护分析和分子克隆等多种下游实验。

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。

样本库信息

植物种类	样本库信息								
蔬菜作物类	小麦	玉米	黄豆	水稻	红薯	油菜	辣椒	花椰菜	苦瓜
	番茄	藕	绿豆	油茶	茶叶	白菜	花生	甘蔗	锦绣苋
	蓖麻	糠稷							
树木类	木槿	柳树	红瑞木	青钱柳	火力楠	构树	梧桐	卫矛	松树
	银杏	金柑	胡椒木						
果树类	海棠	无花果	石榴	梨	桃	榆叶梅	苹果	葡萄	柑橘
	柚子	冬枣	楠木	杏	南酸枣	芒果	火龙果		
观赏植物	金钟花	向日葵	万寿菊	凌霄	黑心金光菊	黄花菜	紫薇	黄刺玫	玉簪
	锦带花	月季	野蔷薇	紫丁香	射干花	袖珍椰子	千屈菜	鸡冠花	茉莉花
	多肉	绿萝	滇杨	三角梅	马缨丹	兰花草	蕨类	紫甘蓝	
草本藤本	三叶草	孔雀草	狗尾草	苜蓿	萱草	刺山柑	草莓	拟南芥	蓼蓝
	佛甲草	羊茅	红麦瓶草						
中草药类	三七	茯苓	铁皮石斛	百合	百脉根	连翘	甘草	天麻	广藿香
	半夏	蒲公英	胡黄连	白术	当归	黄精	西洋参	罗汉松	金钱草
	天门冬	乌药	黄芪						
藻类、藓类	衣藻	小金发藓	节茎曲柄藓	小球藻	硅藻	圆心萍	莱茵衣藻	红藻	地钱
	米氏凯伦藻								
种子类	红豆	松柳	紫苏	棉花	油葵	香草	黄瓜	猕猴桃	高粱
真菌	香菇	黑曲霉	土曲霉	辣椒疫霉	羊肚菌	稻曲菌	酵母	红曲霉	

DNase I储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550 μ l RNase-Free ddH₂O中，轻柔混匀，分装后-30~-15 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。

注意：从-30~-15 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于2-8 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。

操作步骤

A、手工操作步骤

使用前请先在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上标签。

以下所有离心步骤均在室温下进行。

一、快速不暂停流程（适用于高得率和多糖多酚样本）

1. 匀浆处理:

取30-100 mg植物叶片或果实果肉在液氮中迅速研磨成粉末，加入800 μ l裂解液TSP、20 μ l蛋白酶K和50 μ l核酸保护剂ST，立即涡旋剧烈震荡混匀。室温静置5 min。

注意1：种子类样本建议使用30 mg左右，一般样本建议上样50 mg左右，RNA含量低的样本可以使用100 mg的起始样本量。

注意2：由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的RNA含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

2. 12,000 rpm (~13,400 \times g)，4 $^{\circ}$ C离心5 min。

3. 转移700 μ l上清液至新的1.5 ml EP管中，缓慢加入200 μ l结合增强剂ICBP，充分混匀，加入20 μ l磁珠悬浮液BE（100 mg/ml）。

注意：磁珠悬浮液BE使用前请充分涡旋混匀。

4. 震荡混匀5 min，将离心管放置于磁力架上静置1 min，待磁珠完全吸附时小心去除液体。

5. 加入900 μ l缓冲液SGBP，震荡混匀3 min，放置于磁力架上静置吸附1 min，去上清。

6. 加入700 μ l缓冲液RDC溶液和5 μ l DNase I储存液，轻柔混匀，室温放置15 min，放置于磁力架上静置吸附1 min，去上清。

7. 加入900 μ l缓冲液SGBP，震荡混匀3 min，放置于磁力架上静置吸附1 min，去上清。

8. 加入700 μ l漂洗液RW4，震荡混匀3 min，放置于磁力架上静置吸附1 min，去上清。

9. 加入900 μ l漂洗液RW（**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**），震荡混匀3 min，放置于磁力架上静置吸附1 min，去上清。

10. 室温晾干5 min。

11. 加入50-100 μ l RNase-Free ddH₂O，轻轻混匀，室温放置5 min（45 $^{\circ}$ C加热洗脱可以提高得率），放置于磁力架上静置吸附2 min，将上清转移到新的EP管中。

注意：乙醇残留会抑制后续的酶反应，所以晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥太长时间，以免难以洗脱RNA。RNA样品请在-90~-65 $^{\circ}$ C中保存。

二、慢速暂停流程（适用于低得率和包含miRNA样本）

注意：选择此流程，需提前自备去蛋白液RD（客户自备，TIANGEN，目录号：RK122-01）。

1. 匀浆处理：

取30-100 mg植物叶片或果实果肉在液氮中迅速研磨成粉末，加入800 μ l裂解液TSP、20 μ l蛋白酶K和50 μ l核酸保护剂ST，立即涡旋剧烈震荡混匀。室温静置5 min。

注意1：种子类样本建议使用30 mg左右，一般样本建议上样50 mg左右，RNA含量低的样本可以使用100 mg的起始样本量。

注意2：由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的RNA含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

2. 12,000 rpm (~13,400 \times g)，4 $^{\circ}$ C离心5 min。

3. 转移700 μ l上清液至新的1.5 ml EP管中，缓慢加入200 μ l结合增强剂ICBP，充分混匀，加入20 μ l磁珠悬浮液BE（100 mg/ml）。

注意：磁珠悬浮液BE使用前请充分涡旋混匀。

4. 震荡混匀5 min，将离心管放置于磁力架上静置1 min，待磁珠完全吸附时小心去除液体。

5. 加入900 μ l缓冲液SGBP，震荡混匀3 min，放置于磁力架上静置吸附1 min，去上清。

6. 加入70 μ l缓冲液RDC溶液和5 μ l DNase I储存液，轻柔混匀，室温放置15 min，保留溶液。

注意：此处不同于快速不暂停程序，为了更好的回收低浓度RNA和miRNA，需要保留溶液。

7. 向上述离心管中加入700 μ l去蛋白液RD（客户自备，TIANGEN，目录号：RK122-01，使用前请先检查是否已加入无水乙醇），震荡混匀3 min，放置于磁力架上静置吸附1 min，去上清。

8. 加入900 μ l漂洗液RW4，震荡混匀3 min，放置于磁力架上静置吸附1 min，去上清。

9. 加入900 μ l漂洗液RW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），震荡混匀3 min，放置于磁力架上静置吸附1 min，去上清。

10. 室温晾干5 min。

11. 加入50-100 μ l RNase-Free ddH₂O，轻轻混匀，室温放置5 min（45 $^{\circ}$ C加热洗脱可以提高得率），放置于磁力架上静置吸附2 min，将上清转移到新的EP管中。

注意：乙醇残留会抑制后续的酶反应，所以晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥太长时间，以免难以洗脱RNA。RNA样品请在-90~-65 $^{\circ}$ C中保存。

B、TGuide S96核酸提取仪自动化流程

使用前请先在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上标签。

以下所有离心步骤均在室温下进行。

一、快速不暂停流程（适用于高得率和多糖多酚样本）

1. 匀浆处理:

取30-100 mg植物叶片或果实果肉在液氮中迅速研磨成粉末，加入800 μ l裂解液TSP、20 μ l蛋白酶K和50 μ l核酸保护剂ST，立即涡旋剧烈震荡混匀。室温静置5 min。

注意1: 种子类样本建议使用30 mg左右，一般样本建议上样50 mg左右，RNA含量低的样本可以使用100 mg的起始样本量。

注意2: 由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的RNA含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

2. 12,000 rpm (~13,400 \times g)，4 $^{\circ}$ C 离心5 min，转移700 μ l上清液至含结合增强剂ICBP的深孔板中。

3. 按照下面板位进行溶液的分装：

板位分布	E	F	G	H
试剂组成	Buffer SGBP 800 μ l MagAttract Suspension BE 20 μ l 磁棒套	DNase I 5 μ l Buffer RDC 700 μ l	Buffer RW 800 μ l	
板位分布	A	B	C	D
试剂组成	样本上清 700 μ l Buffer ICBP 200 μ l	Buffer SGBP 800 μ l	Buffer RW4 800 μ l	RNase-Free ddH ₂ O 100 μ l

注意: 为避免影响DNase I的活性，DNase I和缓冲液RDC现用现分。

4. 将磁棒套放在磁珠悬浮液BE的深孔板中，运行TGuide S96全自动核酸提取纯化仪提取实验程序。

实验程序如下表所示：

步骤	板位设置	混合体积 (μl)	混合速度	混合时间 (min)	沉淀时间 (sec)	磁吸次数	磁吸速度 (mm/s)	加热板位	加热温度 (°C)	悬停时间 (min)	自动暂停	抓手动作
Tip	E	800	中速	0	10	—	—	—	—	—	—	抓取
Mixing	A	900	中慢	2	10	—	—	—	—	—	—	—
Collect Beads	E	900	中慢	0.2	10	1	0.8	—	—	—	—	—
Binding	A	900	中慢	5	10	2	0.8	—	—	—	—	—
Wash-I	E	800	中速	2	10	1	1	—	—	—	—	—
DNaseI	F	710	中速	12	10	1	0.8	—	—	—	—	—
Wash-II	B	800	中速	2	10	1	1	—	—	—	—	—
Wash-III	C	800	中速	2	10	1	1	—	—	—	—	—
Wash-IV	G	800	中速	2	10	2	1	—	—	5	—	—
Elution	D	100	中慢	6	10	3	0.8	—	—	—	—	—
Finish	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	释放

5. TGuide S96全自动核酸提取纯化仪提取实验程序结束后，将D板位96深孔板中的RNA吸出，并于-90~-65℃保存。

二、慢速暂停流程（适用于低得率和包含miRNA样本）

注意：选择此流程，需提前自备去蛋白液RD（客户自备，TIANGEN，目录号：RK122-01）。

1. 匀浆处理：

取30-100 mg植物叶片或果实果肉在液氮中迅速研磨成粉末，加入800 μ l裂解液TSP、20 μ l蛋白酶K和50 μ l核酸保护剂ST，立即涡旋剧烈震荡混匀。室温静置5 min。

注意1：种子类样本建议使用30 mg左右，一般样本建议上样50 mg左右，RNA含量低的样本可以使用100 mg的起始样本量。

注意2：由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的RNA含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

2. 12,000 rpm（~13,400 \times g），4 $^{\circ}$ C 离心5 min，转移700 μ l上清液至含结合增强剂ICBP的深孔板中。

3. 按照下面板位进行溶液的分装：

板位分布	E	F	G	H
试剂组成	Buffer SGBP 800 μ l MagAttract Suspension BE 20 μ l 磁棒套	DNase I 5 μ l Buffer RDC 70 μ l 暂停后加入700 μ l 去蛋白液RD（客户自备）	Buffer RW 800 μ l	
板位分布	A	B	D	D
试剂组成	样本上清700 μ l Buffer ICBP 200 μ l		Buffer RW4 800 μ l	RNase-Free ddH ₂ O 100 μ l

注意：为避免影响DNase I的活性，DNase I和缓冲液RDC现用现分。

4. 将磁棒套放在磁珠悬浮液BE的深孔板中，运行TGuide S96全自动核酸提取纯化仪提取实验程序。

实验程序如下表所示：

步骤	板位设置	混合体积(μl)	混合速度	混合时间(min)	沉淀时间(sec)	磁吸次数	磁吸速度(mm/s)	加热板位	加热温度(°C)	悬停时间(min)	自动暂停	抓手动作
Tip	E	800	中速	0.2	10	—	—	—	—	—	—	抓取
Mixing	A	900	中慢	2	10	—	—	—	—	—	—	—
Collect Beads	E	900	中慢	0.2	10	1	0.8	—	—	—	—	—
Binding	A	900	中慢	5	10	2	0.8	—	—	—	—	—
Wash-I	E	800	中速	2	10	1	1	—	—	—	—	—
DNaseI	F	80	中速	12	—	—	—	—	—	—	是	—
Wash-II	F	800	中速	2	10	1	1	—	—	—	—	—
Wash-III	C	800	中速	2	10	1	1	—	—	—	—	—
Wash-IV	G	800	中速	2	10	2	1	—	—	5	—	—
Elution	D	100	中慢	6	10	3	0.8	—	—	—	—	—
Finish	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	释放

注意：暂停时在DNaseI板中加入去蛋白液RD 700 μl，放回深孔板，继续运行程序。

5. TGuide S96全自动核酸提取纯化仪提取实验程序结束后，将D板位96深孔板中的RNA吸出，并于-90~-65℃保存。

C、TGuide S16核酸提取仪自动化流程

使用前请先在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上标签。

以下所有离心步骤均在室温下进行。

一、快速不暂停流程（适用于高得率和多糖多酚样本）

1. 匀浆处理:

取30-100 mg植物叶片或果实果肉在液氮中迅速研磨成粉末，加入800 μ l裂解液TSP、20 μ l蛋白酶K和50 μ l核酸保护剂ST，立即涡旋剧烈震荡混匀。室温静置5 min。

注意1: 种子类样本建议使用30 mg左右，一般样本建议上样50 mg左右，RNA含量低的样本可以使用100 mg的起始样本量。

注意2: 由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的RNA含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

2. 12,000 rpm (~13,400 \times g)，4 $^{\circ}$ C 离心5 min，转移700 μ l上清液至含结合增强剂ICBP的深孔板中。

3. 按照下面板位进行溶液的分装：

1/7列	2/8列	3/9列	4/10列	5/11列	6/12列
样本上清 Buffer ICBP	Buffer SGBP	DNase I Buffer RDC	Buffer RW4	RNase-Free ddH ₂ O	Buffer RW MagAttract Suspension BE
700 μ l 200 μ l	800 μ l	5 μ l 700 μ l	800 μ l	100 μ l	800 μ l 20 μ l

注意: 为避免影响DNase I的活性，DNase I在运行前加入到第3/9列中，现用现加。

4. 将磁棒套插入磁棒套架卡槽内并确保卡扣到位，运行TGuide S16全自动核酸提取纯化仪提取实验程序。

实验程序如下表所示：

步骤	槽位	名称	混合时间 (min)	混合速度	晾干时间 (min)	体积 (μl)	温度 (°C)	磁吸段数	每段磁吸时间 (sec)	液面吸磁时间 (sec)	循环次数	磁吸速度 (mm/s)
1	6	移磁珠	0.5	7	0	900	--	5	5	3	2	2
2	2	存磁珠	0.5	7	0	900	--	5	5	3	2	--
3	1	裂解	5	8	0	900	--	1	0	0	0	--
4	2	移磁珠	0.5	7	0	900	--	5	5	3	2	2
5	1	结合	5	8	0	900	--	5	5	3	2	2
6	2	漂洗1	3	7	0	900	--	5	5	0	2	2
7	3	DNase I	12	3	0	80	--	1	5	3	2	2
8	2	漂洗2	5	7	0	780	--	5	5	3	2	2
9	4	漂洗3	3	7	0	700	--	5	5	0	2	2
10	6	漂洗4	3	7	6	700	--	5	5	0	2	2
11	5	洗脱	5	7	0	80	45	5	5	5	2	2
12	6	弃磁珠	0.5	5	0	800	--	1	0	0	0	--

5. 自动化提取程序结束后，将96深孔板第5/11孔中的RNA吸出，并于-90~-65℃保存。

二、慢速暂停流程（适用于低得率和包含miRNA样本）

注意：选择此流程，需提前自备去蛋白液RD（客户自备，TIANGEN，目录号：RK122-01）。

1. 匀浆处理：

取30-100 mg植物叶片或果实果肉在液氮中迅速研磨成粉末，加入800 μl裂解液TSP、20 μl蛋白酶K和50 μl核酸保护剂ST，立即涡旋剧烈震荡混匀。室温静置5 min。

注意1：种子类样本建议使用30 mg左右，一般样本建议上样50 mg左右，RNA含量低的样本可以使用100 mg的起始样本量。

注意2：由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的RNA含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

2. 12,000 rpm (~13,400×g)，4℃离心5 min，转移700 μl上清液至含结合增强剂ICBP的深孔板中。

3. 按照下面板位进行溶液的分装：

1/7列	2/8列	3/9列	4/10列	5/11列	6/12列
样本上清 Buffer ICBP	Buffer SGBP	DNase I Buffer RDC	Buffer RV4	RNase-Free ddH ₂ O	Buffer RV Maglatch Suspension BE
700 μ l 200 μ l	800 μ l	5 μ l 70 μ l	800 μ l	100 μ l	800 μ l 20 μ l

注意：为避免影响DNase I的活性，DNase I在运行前加入到第3/9列中，现用现加。

4. 将磁棒套插入磁棒套架卡槽内并确保卡扣到位，运行TGuide S16全自动核酸提取纯化仪提取实验程序。

实验程序如下表所示：

步骤	槽位	名称	混合时间 (min)	混合速度	晾干时间 (min)	体积 (μ l)	温度 ($^{\circ}$ C)	磁吸段数	每段磁吸时间 (sec)	液面吸磁时间 (sec)	循环次数	磁吸速度 (mm/s)
1	6	移磁珠	0.5	7	0	900	--	5	5	3	2	2
2	2	存磁珠	0.5	7	0	900	--	5	5	3	2	--
3	1	裂解	5	8	0	900	--	1	0	0	0	--
4	2	移磁珠	0.5	7	0	900	--	5	5	3	2	2
5	1	结合	5	8	0	900	--	5	5	3	2	2
6	2	漂洗1	3	7	0	900	--	5	5	0	2	2
7	3	DNase I	12	3	0	80	--	0	0	0	0	--
8	3	暂停	在3、9列孔内加入700 μ l 去蛋白液RD（客户自备）									
9	3	漂洗2	5	7	0	780	--	5	5	3	2	2
10	4	漂洗3	3	7	0	700	--	5	5	0	2	2
11	6	漂洗4	3	7	6	700	--	5	5	0	2	2
12	5	洗脱	5	7	0	80	45	5	5	5	2	2
13	6	弃磁珠	0.5	5	0	800	--	1	0	0	0	--

5. 自动化提取程序结束后，将96深孔板第5/11孔中的RNA吸出，并于-90~-65 $^{\circ}$ C保存。



TIANGEN官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

RNA纯度及浓度检测

完整性：RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳（电泳条件：胶浓度1.2%；0.5×TBE电泳缓冲液；150 V，15 min）检测完整性。由于细胞中70-80%的RNA为rRNA，电泳后UV下应能看到非常明显的rRNA条带。rRNA大小分别约为5 kb和2 kb，分别相当于28S和18S rRNA；植物叶片中由于含有大量的叶绿体RNA，可见4条或更多rRNA。植物RNA样品中最大rRNA亮度应为次大rRNA亮度的1.5-2.0倍，否则表示RNA样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度：OD₂₆₀/OD₂₈₀比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA，OD₂₆₀/OD₂₈₀读数在1.8-2.1之间，比值为2.0是高质量RNA的标志。OD₂₆₀/OD₂₈₀读数受测定所用溶液的pH值影响。同一个RNA样品，假定在10 mM Tris，pH7.5溶液中测出的OD₂₆₀/OD₂₈₀读数1.8-2.1之间，在水溶液中所测读数则可能在1.5-1.9之间，但这并不表示RNA不纯。

浓度：取一定量的RNA提取物，用RNase-Free ddH₂O稀释n倍，用RNase-Free ddH₂O将分光光度计调零，取稀释液进行OD₂₆₀、OD₂₈₀测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times (\text{稀释倍数}n) \times 40$$