Code No. 9769S

研究用

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit

说明书

v201903Da

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存	1
● 预防 RNase 污染的注意事项	1
● 使用前的注意事项	2
● 不同植物材料提取流程	2
● 试剂盒操作流程简图	3
● 操作方法（Total RNA 提取）	4
● 实验例	5
● 不同植物组织的 RNA 提取量	6
● 附注（富含 Small RNA 的 Total RNA 提取）	6
● Q&A	7

● 制品说明

本试剂盒是小量提取植物组织 Total RNA 的试剂盒。试剂盒采用了特别的裂解系统，可以对各种简单的植物组织材料（叶片、茎、幼苗等）、富含多糖多酚的植物组织材料（果实、种子等）、真菌等进行 RNA 的提取，适用范围广泛。按照标准流程，使用本试剂盒可以有效提取分子量大于 200 nt 的 RNA，也可以按照可选步骤提取得到包含 Small RNA (<200 nt)的 Total RNA。试剂盒中包含了 RNA 提取所需的全部试剂，无需额外购买其它试剂。

本试剂盒具有高效、快速、方便之特点，组织或细胞裂解后，提取操作仅需 30 分钟便可完成。提取过程中无需苯酚氯仿抽提等步骤。利用该试剂盒提取的 RNA 纯度高，基本不含蛋白质及基因组 DNA 污染。使用本试剂盒可以从 50～100 mg 植物组织中纯化得到多至数十微克的高纯度 RNA。提取得到的 RNA 可以直接用于 Northern 杂交、斑点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RNA 分解酶的保护分析、RT-PCR、Real Time RT-PCR、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

● 制品内容（10 次量）

本试剂盒分为 Part Ⅰ和 Part Ⅱ两部分。

■ Part Ⅰ　-20℃保存

50×DTT Solution	125 μl
Recombinant DNase Ⅰ (RNase-free；5 U/μl)	250 U
10×DNase Ⅰ Buffer	62.5 μl

■ Part Ⅱ　室温（15℃～25℃）下保存

Buffer PE	5 ml
Buffer NB	500 μl
Buffer RL*1*2	5 ml
Buffer RWA*2	6 ml
Buffer RWB*3	2.7 ml×2
RNase Free dH_2O	1.5 ml×2
RNA Spin Column	10 套
RNase Free Collection Tube（1.5 ml）	10 支

*1 操作前请在 Buffer RL 中加入 50×DTT Solution，每 1 ml 的 Buffer RL 中加入 20 μl 的 50×DTT Solution。此裂解液最好现用现配。加入 50×DTT Solution 的 Buffer RL 裂解液可在室温下放置 1 个月。

*2 含有强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即到医院进行处理。

*3 首次使用前，向 Buffer RWB 中添加 6.3 ml 的 100%乙醇。

【试剂盒之外所需准备试剂】

◆ 无水乙醇

◆ 80%乙醇（0.1% DEPC 处理水配制）

● 保存

1. 本试剂盒中的 Part Ⅰ请于-20℃保存。
2. 本试剂盒中的 Part Ⅱ请于室温（15℃～25℃）下保存。

● 预防 RNase 污染的注意事项

RNA 制备的关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用 RNA 操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

◆使用器具尽量使用一次性塑料器皿，若用玻璃器皿，应在使用前按下列方法进行处理。

⑴用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37℃下处理 12 小时。

⑵然后在 120℃下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

RNA 实验用的器具建议专门使用，不要用于其它实验。

◆试剂配制

用于 RNA 实验的试剂，须使用干热灭菌（180℃，60 分钟）或使用上述方法进行 DEPC 水处理灭菌后的玻璃容器盛装（也可以使用 RNA 实验用的一次性塑料容器），使用的无菌水须用 0.1%的 DEPC 处理后再进行高温高压灭菌。

RNA 实验用的试剂和无菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

● 使用前的注意事项

- ◆ Buffer RL 若出现沉淀，请于 60℃加热溶解，待恢复至室温后使用。
- ◆ 操作前请在 Buffer RL 中加入 50×DTT Solution 至终浓度为 2%，即每 1 ml 的 Buffer RL 中加入 20 μl 的 50×DTT Solution。此裂解 Buffer 最好现用现配。加入 50×DTT Solution 的 Buffer RL 可在室温放置 1 个月。
- ◆ Buffer PE 若出现沉淀，请于 37℃加热溶解，待恢复至室温后使用。
- ◆ Buffer RWB 在首次使用前，请添加 6.3 ml 的 100%乙醇，混合均匀。
- ◆ RNA Spin Column 的最大容积为 600 μl，使用时如果液体的体积超出最大容积，请分批加入。
- ◆ 以下实验操作，如无特殊说明，均在室温进行。

● 不同植物材料提取流程

针对不同的植物材料，本试剂盒提供两种不同的提取流程（Protocol-Ⅰ & Protocol-Ⅱ），Protocol-Ⅰ 主要适用于较为简单的组织材料（叶片、幼苗等）的 RNA 提取，Protocol-Ⅱ 适用于较为复杂的组织材料（块茎、果实等）的 RNA 提取。Table1 是不同材料的适宜提取流程表，提取前可参照该表选取提取流程。如果提取的材料不在该表范围，建议先利用 Protocol-Ⅰ 进行提取，如果效果不佳，再利用 Protocol-Ⅱ 进行提取。

Table1 不同材料的适宜提取流程表

提取样品种类	提取材料例	适宜提取流程	
		Protocol-Ⅰ	Protocol-Ⅱ
简单植物叶片、幼苗、茎	烟草叶片、拟南芥叶片、草本植物幼苗、柳树叶片等	√	
水果的幼苗、叶片	苹果幼苗、香蕉叶片		√
多糖多酚的植物叶片	柏树叶片、松针、红掌叶片、银杏叶片		√
淀粉含量高的植物材料	植物的种子（玉米、水稻等）、块茎（马铃薯、紫薯等）		√
油性高的植物材料	黄豆种子、花生种子等	√	√
糖分高的果实	香蕉果实、芒果等		√
水分高的果实	苹果、香梨等	√	
真菌材料	香菇菌丝体、平菇菇子实体	√	

● 试剂盒操作流程简图

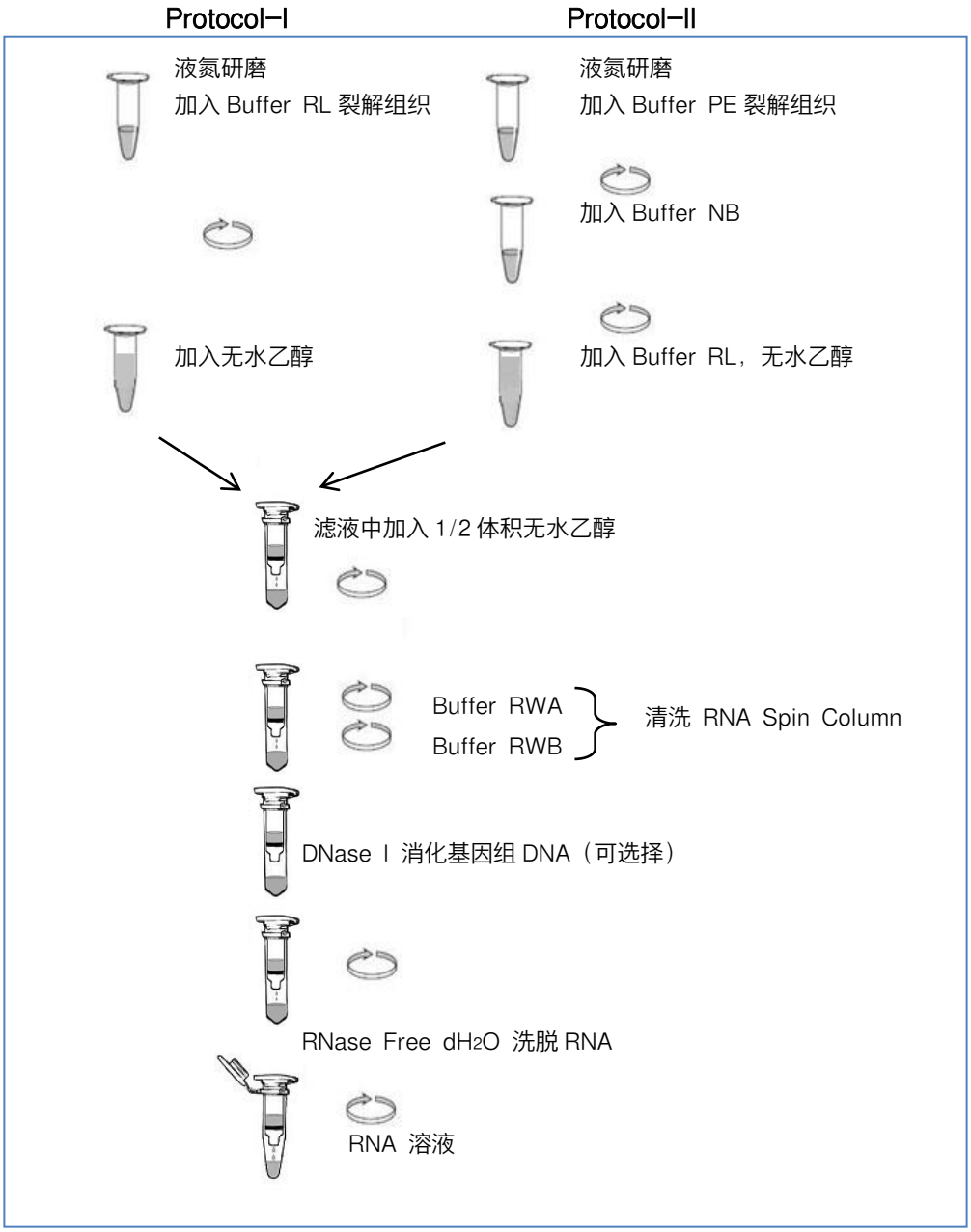

图 1：试剂盒操作流程简图

● 操作方法

样品的裂解

本试剂盒采用了两套特别的裂解系统，分别对简单的植物材料以及富含多糖多酚等较难提取的材料进行 RNA 的提取。简单的植物材料 RNA 提取请参照 Protocol-I 进行，提取材料的起始量为 50～100 mg，适宜起始量为 50 mg；多糖多酚等较难提取材料的 RNA 提取请参照 Protocol-II 进行，提取材料的起始量为 20～50 mg，适宜起始量为 50 mg。

Protocol-I ： 简单植物组织的裂解

1. 将新鲜的或超低温冻存的植物组织样品迅速转移至用液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状（无明显的可见颗粒，如果没有研磨彻底会影响 RNA 的收率和质量）。将研磨成粉末状的样品（50～100 mg）加入到含有 450 μl Buffer RL（使用前请确认已加入 50×DTT Solution）的 1.5 ml 灭菌 tube 中，用移液器反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。
2. 将裂解液 12,000 rpm，4℃离心 5 分钟。
3. 将上清液小心吸取到新的 1.5 ml 灭菌 tube 中。
4. 以下步骤按照“Total RNA 的提取”流程进行。

Protocol-II 多糖多酚植物组织的裂解

1. 将新鲜的或超低温冻存的植物组织样品迅速转移至用液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状（无明显的可见颗粒，如果没有研磨彻底会影响 RNA 的收率和质量）。将研磨成粉末状的样品（20～50 mg）加入到含有 450 μl Buffer PE 的 1.5 ml 灭菌 tube 中，用移液器反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。
2. 将裂解液 12,000 rpm，4℃离心 5 分钟。
3. 将上清液小心吸取到新的 1.5 ml 灭菌 tube 中。加入上清液 1/10 体积的 Buffer NB（此时会出现沉淀），Vortex 振荡混匀。
4. 12,000 rpm，4℃离心 5 分钟。
5. 将上清液小心吸取到新的 1.5 ml 灭菌 tube 中。加入 450 μl 的 Buffer RL（使用前请确认已加入 50×DTT Solution），使用移液枪将溶液混合均匀。
6. 以下步骤按照“Total RNA 的提取”流程进行。

Total RNA 的提取

1. 加入样品裂解步骤中上清液或混合液 1/2 体积的无水乙醇（此时可能会出现沉淀），使用移液枪将溶液混合均匀。
2. 立即将混合液（含沉淀）全部转入到 RNA Spin Column（含 2 ml Collection Tube）中。（如果混合液的体积大于 600 μl，请分批加入，每次加入的体积不要大于 600 μl。）
3. 12,000 rpm，离心 1 分钟，弃滤液。将 RNA Spin Column 放回到 2 ml Collection Tube 中。
4. 将 500 μl 的 Buffer RWA 加入至 RNA Spin Column 中，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。
5. 将 600 μl 的 Buffer RWB 加入至 RNA Spin Column 中，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。
   注）请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。
   请沿 RNA Spin Column 管壁四周加入 Buffer RWB，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。
6. DNase I 消化（可选择）：
   利用本试剂盒提取 RNA 时可以有效地去除植物组织中绝大部分的基因组 DNA，提取的 RNA 一般不含基因组 DNA。若后续实验对 RNA 纯度要求比较严格，可以选择性地在 RNA Spin Column 膜上进行 DNase I 消化。

① DNase I 反应液的配制：取 5 μl 10×DNase I Buffer，4 μl Recombinant DNase I （RNase free，5 U/μl），41 μl RNase free dH_2O 到新的 1.5 ml RNase Free Tube 中，混合均匀。

② 向 RNA Spin Column 膜中央加入 50 μl DNase I 反应液，室温静置 15 分钟。

③ 向 RNA Spin Column 膜中央加入 350 μl 的 Buffer RWB，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。

7. 重复操作步骤 5。
8. 将 RNA Spin Column 重新安置于 2 ml Collection Tube 上，12,000 rpm 离心 2 分钟。
9. 将 RNA Spin Column 安置于 1.5 ml 的 RNase Free Collection Tube（试剂盒提供）上，在 RNA Spin Column 膜中央处加入 50～200 μl 的 RNase Free dH_2O 或 0.1% DEPC 处理水，室温静置 5 分钟。
10. 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。
11. 若想提高 RNA 的收量，可再向 RNA Spin Column 膜中央加入 50～200 μl 的 RNase Free dH_2O 或 0.1% DEPC 处理水洗脱 RNA；若要得到高浓度的 RNA，也可以将第一次的洗脱液重新加回至 RNA Spin Column 中，室温静置 5 分钟，12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。

● 实验例

1. 从植物幼苗中提取 RNA 的实验例

使用本试剂盒利用 Protocol–I 流程从 100 mg 的植物幼苗中提取 RNA，得到了数十微克的高纯度 RNA。电泳结果见图 2。

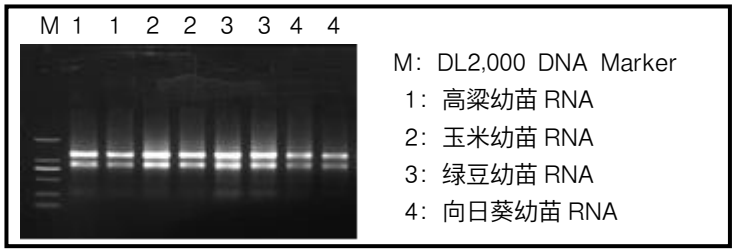

图 2. 从植物幼苗中提取 RNA

2. 从植物种子中提取 RNA 的实验例

使用本试剂盒利用 Protocol–II 流程从 50 mg 的植物种子中提取 RNA，得到了数十微克的高纯度 RNA。电泳结果见图 3。

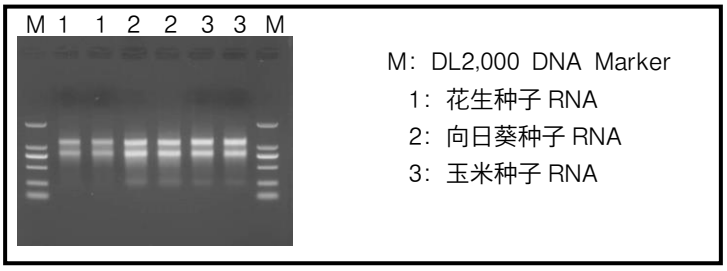

图 3. 从植物种子中提取 RNA

3. 从植物果实中提取 RNA 的实验例

使用本试剂盒利用 Protocol–I 流程从 100 mg 的植物果实中提取 RNA，得到了高纯度的 RNA。电泳结果见图 4。

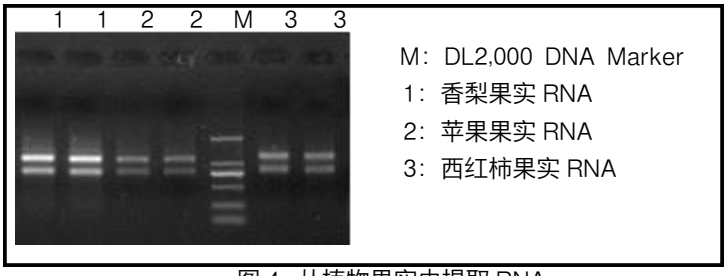

图 4. 从植物果实中提取 RNA

4. 提取的 RNA 应用实验例

使用本试剂盒提取烟草叶片 RNA 并进行 5’RACE 的获取，成功获得了 1.8 kb 的目的片段。电泳结果见图 5。

图 5. 应用实验例

● 不同植物组织的 RNA 提取量

对于不同的植物材料 RNA 收量如 Table2 所示。由于植物材料的 RNA 含量与其生长状态及新鲜程度有关，下表仅供参考。

样品种类	样品名称	RNA 收量
种子	黄豆种子	40～50 μg /50 mg
	花生种子	20～25 μg/50 mg
	玉米种子	10～15 μg/100 mg
果实	香蕉果实	2～3 μg/50 mg
	苹果果实	1～2 μg/50 mg
块茎	马铃薯	10～15 μg/50 mg
	紫薯	4～5 μg/50 mg
真菌	平菇子实体	10～15 μg/50 mg
	香菇菌丝	10～15 μg/50 mg
植物叶片	银杏叶片	10～15 μg/50 mg
	玉米叶片	30～40 μg/100 mg
	拟南芥叶片	10～15 μg/100 mg
	烟草叶片	20～30 μg/100 mg
	柳树叶片	40～50 μg/100 mg
	柏树叶片	20～30 μg/100 mg

Table 2 不同组织的 RNA 提取量

● 附注：（提取包含 Small RNA 的 Total RNA）

利用本试剂盒的上述流程可以有效地进行分子量大于 200 nt 的 Total RNA 提取，而分子量小于 200 nt 的 Small RNA 收量相对较低。如果希望得到较多的 Small RNA，可以按照以下的流程进行提取，提取得到的 RNA 中富含 Small RNA。但利用该方法提取的 Total RNA 收量会相对降低，提取 RNA 含量较少的组织时请适当加大提取的起始量，并按比例增加试剂的使用量。

◆ 样品的裂解

样品的裂解方法同操作方法中的样品裂解方法。样品裂解后，按照以下实验方法进行 Total RNA 的提取。

注）实验前请准备 80% 的乙醇（0.1% DEPC 处理水配制）。

◆ **富含 Small RNA 的 Total RNA 的提取**

1. 加入样品裂解步骤中上清液或混合液 1.5 倍体积的无水乙醇（此时可能会出现沉淀），使用移液枪将溶液混合均匀。
2. 立即将混合液（含沉淀）全部转入到 RNA Spin Column（含 2 ml 收集管）中。（如果混合液的体积大于 600 μl，请分批加入，每次加入的体积请不要大于 600 μl。）
3. 12,000 rpm，离心 1 分钟，弃滤液。将 RNA Spin Column 放回到 2 ml 收集管中。
4. 将 600 μl 80% 的乙醇加入至 RNA Spin Column 中，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。
   注）请沿 RNA Spin Column 管壁四周加入 80% 的乙醇，这有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。
5. DNase I 消化（可选择）：
   利用本试剂盒提取 RNA 时可以去除大部分的基因组 DNA，对于基因组 DNA 含量较高的材料或后续实验对 RNA 纯度要求比较严格，可以选择性地在 RNA Spin Column 上进行 DNase I 消化。
   ① DNase I 反应液的配制：取 5 μl 10×DNase I Buffer，4 μl Recombinant DNase I (RNase –free，5 U/μl），41 μl RNase Free dH_2O 到新的 1.5 ml RNase Free tube 中，混合均匀。
   ② 每个 RNA Spin Column 膜中加入 50 μl DNase I 反应液，室温静置 15 分钟。
   ③ 每个 RNA Spin Column 膜中加入 350 μl 的 RWB，12,000 rpm 离心 30 秒钟，弃滤液。
6. 重复操作步骤 4。
7. 将 RNA Spin Column 重新安置于 2 ml 收集管上，12,000 rpm 离心 2 分钟。
8. 将 RNA Spin Column 安置于 1.5 ml 的 RNase Free Collection tube 上（试剂盒提供），在 RNA Spin Column 膜的中央处加入 30～100 μl 的 RNase Free dH_2O 或 0.1% DEPC 处理水，室温静置 5 分钟。
9. 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。
10. 若想提高 RNA 的收量，可再向 RNA Spin Column 膜的中央加入 30～100 μl 的 RNase Free dH_2O 或 0.1% DEPC 处理水洗脱 RNA；若要得到高浓度的 RNA，也可以将第一次的洗脱液重新加回至 RNA Spin Column 中。室温静置 5 分钟。12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 RNA。

● **Q&A**

Q1：为什么RNA收量过低?

A1：利用该试剂盒提取的组织或细胞的提取量请参考“不同组织的RNA提取量”。如果RNA的收量过低，则可能有以下几种原因：

① 样品的裂解不充分。样品的充分裂解是使用该试剂盒提取高质量RNA的关键。关于样品的裂解请参考操作方法中的“样品的裂解”。

② 样品的起始量太多。使用该试剂盒提取简单植物材料的适宜起始量为50～100 mg，多糖多酚的材料起始量为20～50 mg。

③ RNA洗脱不充分。建议重复洗脱RNA一次。洗脱时可以将RNase Free dH_2O或0.1% DEPC 处理水在RNA Spin Column 的静置时间延长至10 分钟。

④ 洗脱液中有乙醇残留。在使用Buffer RWB进行RNA Spin Column清洗后没有进行后续的离心过程，造成乙醇的残留，使RNA的收量下降。建议在使用Buffer RWB清洗后再进行一次离心，以去除乙醇的污染。

Q2：RNA发生降解，为什么?

A2：如果提取时发生降解，则可能有以下几种原因：

① 使用的组织材料不够新鲜。提取RNA的组织材料应采用新鲜的组织材料，或将新鲜的组织材料用液氮迅速冷冻后置于–80℃保存。

② 提取RNA时使用的试剂及器材中混有RNA分解酶。实验前请参考“预防RNase污染的注意事项”以避免RNase 的污染。

③ 提取的组织材料中含有大量的RNA分解酶。RNA分解酶较多的组织应当减少样品的起始量，并加大提取Buffer的用量。

Q3：提取的RNA中含有基因组DNA，怎么办?

A3：本试剂盒提供了DNase Ⅰ，能够有效地去除材料中的基因组DNA，一般不会含有基因组的污染。如果提取的RNA中含有基因组的污染，则可能有以下几种原因：

① 样品的裂解不充分。样品不充分裂解会造成基因组DNA的残留。样品的裂解方法请参考操作方法中的组织或细胞的裂解。

② 样品的起始量太多。过多的起始量使得核酸含量过多，DNase Ⅰ消化不完全，造成基因组DNA的残留。不同的组织中基因组的含量不同，对于基因组含量较高的样品，请减少样品的起始量，并增加提取时Buffer RL/Buffer PE的用量，或者增加DNase Ⅰ的用量。

③ 未进行DNase Ⅰ的消化处理。对于部分基因组DNA含量较高的组织材料或后续实验对RNA纯度要求比较严格，则需进行DNase Ⅰ的消化处理。请参考操作方法中的DNase Ⅰ消化步骤进行DNase Ⅰ的消化处理。

Q4：RNA的吸光度代表的含义是什么?

A4 ： 有关RNA的吸光度说明如下：

260 nm、320 nm、230 nm、280 nm下的吸光度分别代表了核酸、背景（溶液浑浊度）、盐浓度和蛋白质等有机物的吸光度值。OD_{260}/OD_{280}（R）体现了RNA中的蛋白质等有机物的污染程度，质量较好的RNA的R值应在1.8～2.0之间，当R<1.8时，溶液中的蛋白质等有机物的污染比较明显；当R>2.2时，说明RNA已经被水解成了单核苷酸。在对核酸进行吸光度检测时，需要注意稀释液应使用TE Buffer。

Q5：RNA的浓度怎样计算?

A5： RNA的浓度可以根据吸光度进行计算：

RNA浓度=（$OD_{260}-OD_{320}$）×稀释倍数×0.04 μg/μl 。

Q6：利用本试剂提取的RNA完整度如何?

A6：利用本试剂盒能够有效提取分子量大于200 nt的Total RNA。如果希望得到Small RNA，可以参照附注部分的“富含Small RNA的Total RNA 的提取”流程进行Small RNA的富集，但是利用该方法提出的Total RNA收量会相对降低。

Q7：如何判断实验材料应使用哪种流程?

A7：可以参考“Table1不同材料的适宜提取流程表”，如仍无法判定应使用哪种，可以先尝试按照Protocol-Ⅰ进行，若提取效果不理想时，再尝试使用 Protocol-Ⅱ进行提取。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686
4006518761，4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: https://www.takarabiomed.com.cn

v201903Da