

## 多糖/多酚植物总RNA提取试剂盒(gDNA清除柱)

货号： NG3021S 50次

试剂盒组成	保存	50次
裂解液PLS	室温	50 ml
裂解/结合液RB	室温	25 ml
漂洗液RE	室温	40 ml
漂洗液RW	室温	10 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free Water	室温	5 ml
基因组DNA清除柱和收集管	室温	50套
RNase-free吸附柱RA和收集管	室温	50套

### 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℃）。
- 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。

### 产品介绍：

本公司成功推出基因组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在高离序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，将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的RNase free water将纯净RNA从硅基质膜上洗脱。

### 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，市面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.多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280典型的比值高达2.1~2.2，基本无DNA残留,可用于RT-PCR，Northern-blot，二代测序和各种实验。

### 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）
- 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和RNA吸附柱RA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PLS和裂解/结合液RB和漂洗液RE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），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。
- 6.个别特殊情况如DNA含量过于丰富造成残留，将RNA提取物用RNase-free的DNase I处理以提高效果

## 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RW瓶加入指定量无水乙醇!

⇒取1ml裂解液PLS至离心管内(如果PLS有析出或者沉淀需先置于65°C水浴重新溶解)，在裂解液PLS中加入5% β-巯基乙醇（1mlPLS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。**β-巯基乙醇是裂解液PLS的关键成分，必要的时候可以提提高终浓度到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%。**

a.液氮中研磨新鲜或-70°C冷冻的材料至细粉。

b.转移100mg-200mg细粉（水分少的样品如叶片种子等可加100mg-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PLS（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12,000 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(1/2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1。

1.将混合物(每次小于700μl，多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱中，（清除柱放入收集管中）12,000 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。**

2.将基因组DNA清除柱子放在一个干净2ml离心管内，在基因组清除柱内加500μl裂解/结合液RB，12,000 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500μl左右，滤过时候损失体积应该减去），加入1/2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。

3.立刻将混合物(每次小于700μl，多可以分两次加入)加入一个吸附柱RA中，（吸附柱放入收集管中）12,000 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.加入700μl 漂洗液RE，室温放置1分钟，12,000rpm 离心30秒，弃掉废液。

5.加入500μl漂洗液RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm 离心30秒，弃掉废液。加入500μl漂洗液RW，重复一遍。

6.将吸附柱RA放回空收集管中，12,000 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。

7.取出吸附柱RA，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30-50μl RNase free water（事先在 65°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。