



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@163.com

RealPure® Plant Seed RNA Extraction Kit

RealPure® 植物种子 RNA 提取试剂盒

● 试剂盒内容及保存:

试剂盒组成	RTR2308-S (5 次)	RTR2308-01 (50 次)	贮存方式
裂解液 RSL	5 ml	30 ml	常温
缓冲液 PRS	0.5 ml	3 ml	常温
裂解液 RL plus	3 ml	30 ml	常温
去蛋白液 RD	3 ml	30 ml	常温
	1.5 ml	25 ml	
漂洗液 RW (浓缩液)	首次使用按照标签加入 无水乙醇	首次使用按照标签加入 无水乙醇	常温
RNase-free 水	1 ml	5 ml	4°C
DNA 清除柱 CS (RNase-free)	5 个	50 个	常温
RNA 吸附柱 CR (RNase-free)	5 个	50 个	常温
收集管	10 个	100 个	常温
2 ml 离心管 (RNase-free)	5 个	50 个	常温
1.5 ml 离心管 (RNase-free)	15 个	150 个	常温
说明书	1 份	1 份	

● 储存条件和效期:

RNase-free 水 4°C 保存; 其他试剂在常温 (25°C 左右) 干燥条件下, 可保存 1 年。试剂盒常温运输。

● 产品简介:

本试剂盒可从植物种子中快速提取总 RNA, 通过独特的裂解系统, 快速去除植物组织中的淀粉、多糖等成分, 释放 RNA。试剂盒配套缓冲液 PRS (Phenolic Remove Solution) 可以去除种子中的多糖多酚对 RNA 提取的影响。另外, 试剂盒配套 DNA 清除柱, 可以消除基因组 DNA 的污染。整个提取过程仅需 20-30 分钟内即可完成, 可以从 50 mg 植物种子中提取数十微克高纯度 RNA, 基本没有 DNA 和蛋白的污染, 可用于 Northern blot、Dot blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等实验。

已经测试的植物种子有: 拟南芥干种子、小麦干种子、水稻干种子、芝麻种子、玉米干种子、豌豆种子、红豆干种子、绿豆干种子、向日葵种子、西瓜种子、油莎豆、花生、大豆等。另外, 该试剂盒也适合于提取块茎、鳞茎的 RNA。

植物 RNA 提取介绍:

由于植物种类繁多，不同的植物种类和部位的样品使用本试剂盒效果不同。我们已经测试成功的植物列表如下:

植物样品种类	提取植物材料	是否添加缓冲液 PRS	推荐裂解液	RNA 质量度		RNA 得量
				A260/280	A260/230	
简单植物叶片、 幼苗、茎	玉米叶片	-	裂解液 RL			30-40 µg/100 mg
	小麦叶片	-	裂解液 RL			40-50 µg/100 mg
	水稻叶片	-	裂解液 RL			45-55 µg/100 mg
	拟南芥叶片	-	裂解液 RL			10-15 µg/100 mg
	烟草叶片	-	裂解液 RL			40-55 µg/100 mg
	绿萝叶片	-	裂解液 RL	1.87	2.21	5-10 µg/100 mg
多糖多酚植物 叶片	银杏叶片	+	裂解液 RL			10-15 µg/50 mg
	松针	+	裂解液 RL			10-15 µg/50 mg
	毛白杨叶片	+	裂解液 RL			20-30 µg/50 mg
	冬青叶片	+	裂解液 RL			1-5 µg/50 mg
	法国梧桐样品	+	裂解液 RL	2.14	1.97	10-20 µg/50 mg
种子	黄豆种子	+	裂解液 RSL			40-50 µg/50 mg
	花生种子	+	裂解液 RSL			20-25 µg/50 mg
	玉米种子	+/-	裂解液 RSL	2.00	2.37	20-40 µg/50 mg
	水稻种子	+	裂解液 RSL			5-10 µg/50 mg
	小麦种子	+/-	裂解液 RSL	2.03	2.28	10-15 µg/50 mg
	高粱种子	+	裂解液 RSL			5-10 µg/50 mg
	绿豆种子	+	裂解液 RSL			5-10 µg/50 mg
	油莎豆	+	裂解液 RSL	2.26	2.17	7-15 µg/50mg
	拟南芥种子	+	裂解液 RSL	2.17	1.98	3-5µg/50mg
	南瓜籽	+	裂解液 RSL	2.27	1.68	10-15µg/50mg
水果果肉	芒果	+	裂解液 RL			1-2 µg/50 mg
	西红柿	+	裂解液 RL			2-3 µg/50 mg
	苹果	+	裂解液 RL			3-5 µg/50 mg
	西瓜	+	裂解液 RL			1-2µg/50 mg
	香蕉	+	裂解液 RL			2-3 µg/50 mg
	梨	+	裂解液 RL			3-5 µg/50 mg
真菌材料	香菇菌丝体	-	裂解液 RL/RSL			2-3 µg/100 mg
	平菇菌丝体	-	裂解液 RL			2-3 µg/100 mg
块茎	马铃薯	+/-	裂解液 RSL			10-15 µg/50 mg
	紫薯	+/-	裂解液 RSL	2.35	1.91	2-5 µg/50 mg

注: + 表示添加, -表示不添加, +/- 表示添加不添加均可, NA 表示无数据

● 准备工作:

- 1 操作前在裂解液 RSL 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 5%，如 500 μ l RSL 中加入 25 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RSL 4 $^{\circ}$ C 可放置 3 天。
- 2 按照标签所示在漂洗液 RW 中加入无水乙醇（自备），混匀后盖紧瓶盖后常温贮存备用。
- 3 准备 65 $^{\circ}$ C 水浴
- 4 所有离心步骤均在常温下进行。

● 操作步骤:

1. 样品处理:

- 1.1 1.5 ml RNase-free 离心管中加入 500 μ l 裂解液 RSL（使用前请先检查是否已加入 β -巯基乙醇），50 μ l 缓冲液 PRS 混匀备用。

注：缓冲液 PRS 有助于去除样品中的多糖和多酚，禾本科植物如水稻，小麦和玉米的种子 RNA 提取中可以不用添加；如不能判断材料是否含多糖和多酚，请加入缓冲液 PRS。

- 1.2 将种子加入到液氮预冷的研钵中，用研杵研磨，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状。取 20-50 mg 粉末迅速加入到离心管中，涡旋剧烈震荡混匀，65 $^{\circ}$ C 水浴放置 5 分钟或常温放置 5 分钟（富含淀粉的材料如小麦、玉米、水稻种子，马铃薯块茎等），间歇混匀，不要涡旋剧烈震荡。

注：一定不要加入超过 50 mg 的粉末，否则样品超过裂解液 RSL 的裂解能力导致 RNA 提取失败。

2. 离心取上清:

13,000 rpm 离心 5 min，小心吸取收集管中的上清至 1.5 ml RNase-free 的离心管中，吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。一般可获得 400 μ l 上清。

注：一些种子富含油脂如花生种子，离心后脂肪位于最上层，用吸头穿越脂肪层吸取上清；禾本科植物如水稻，小麦，玉米，高粱种子会有大量沉淀生产。

3. 去除基因组污染:

上清中加 0.5 倍体积的无水乙醇（如 400 μ l 上清中加入 200 μ l 无水乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入 DNA 清除柱 CS（清除柱放入收集管中）中，13,000 rpm 离心 2 分钟，弃掉收集管中的废液。

注：吸附柱的最大容积是 850 μ l，超过此体积分步上柱，确保全部溶液都通过过滤柱，如果膜上有残留液体，延长离心时间至 5 分钟，保证膜上无残留液体。

4. 洗脱 RNA:

将 DNA 清除柱放入 2 ml RNase-free 离心管中，在清除柱中加入 500 μ l 裂解液 RL plus，13,000 rpm 离心 1 分钟，收集滤液（**注意：RNA 在滤液中，不要丢弃**），滤液中加入 250 μ l 无水乙醇，此时可能会出现沉淀，立即混匀，不要离心。

5. RNA 挂柱:

将全部溶液加入到 RNA 吸附柱 CR 中（吸附柱放入收集管中），13,000 rpm 离心 2 分钟，弃废液。

注：确保溶液全部过滤到收集管中，膜上无残留，如有必要，可以延长离心时间至 5 分钟。

6. 去除 RNA 中的蛋白污染:

向 RNA 吸附柱 CR 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μ l 去蛋白液 RD，13,000 rpm 离心 1 分钟，弃废液。

7. 去除 RNA 中的其他杂质:

向 RNA 吸附柱 CR 中加入 700 μ l 漂洗液 RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 13,000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液。

8. 进一步去除 RNA 中的其他杂质:

向吸附柱 CR 中加入 500 μ l 漂洗液 RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 13,000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液。

9. 关键步骤: 彻底去除吸附柱上的残余乙醇:

将吸附柱 CR 放回收集管中, 确保盖好吸附柱管盖, 13,000 rpm 将吸附柱 CR 空甩离心 2 分钟, 去除吸附柱上的残余液体。

注: 此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 如果有漂洗液残留, 可能会影响后续的 RT 等实验操作。

10. 洗脱得到 RNA:

将 RNA 吸附柱 CR 转入一个新的 1.5 ml RNase-free 离心管中, 向吸附柱 O 型垫圈中央悬空加入 50-100 μ l RNase-free 水 (事先 65 $^{\circ}$ C 预热可提高洗脱效率), 盖好吸附柱管盖, 常温放置 2 分钟, 13,000 rpm 离心 2 分钟。

注: 确保水要加到膜的中央, 不要贴壁加入; 洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ l, 体积过小影响回收效率。

11. RNA 贮存:

RNA 样品-80 $^{\circ}$ C 中保存。

● RNA 产量和质量的评估:

1. RNA 产量:

用分光光度计测定 OD₂₆₀ 的吸光值来计算 RNA 产量。将 RNA 按照一定的比例稀释于 TE 溶液 (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA) 中, 根据以下公式计算:

$$A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 = \mu\text{g RNA/ml}$$

注: 测定 OD 值时, 尽量不要用 RNase-free 水稀释 RNA, 因为 RNase-free 水 pH 较低, 测定的 OD 值偏低。

2. RNA 质量:

凝胶电泳检测: 凝胶电泳中, 完整的 RNA 应该有两条主带: 28S 和 18S, 并且 28S 亮度应该与 18S 相当或是其亮度的 2 倍。可以使用普通的 1 \times TAE 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶浓度 1.5 %, 可以使用高电压, 短时间电泳, 如 7V/cm 电泳, 20 分钟。建议使用 D2000 DNA ladder (Cat: RTM415) 作为 Marker。植物 28S rRNA 迁移率与 1500 bp 类似, 18S rRNA 迁移率与 1000bp 类似。

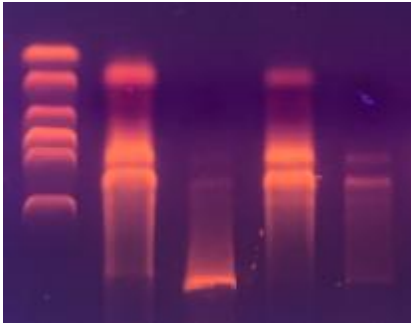
吸光值检测: 可以用 A₂₃₀, A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 的数值表示 RNA 的纯度。纯净的 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值应该为 2, 我们得到的 RNA 样品比值应在 1.8-2.2 之间, 如果比值低于 1.8, 表明 RNA 样品中蛋白污染比较严重。

A₂₆₀/A₂₃₀ 比值应该在 2-2.2 之间。如果此比值低于 2, 表明 RNA 样品中有胍盐, 多糖的污染。

植物种子RNA提取试剂盒操作示意图



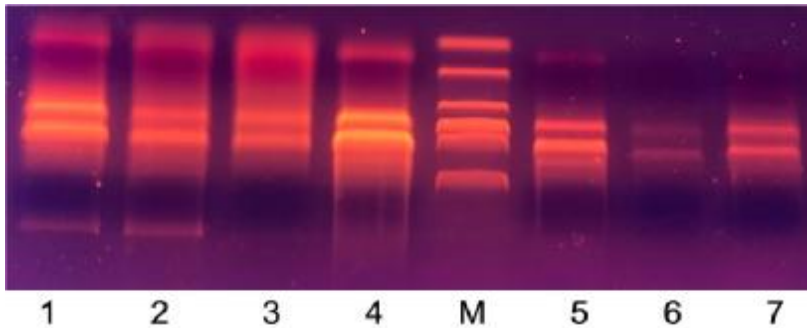
● 实验示例:



花生种子 RNA

- 1, 3 使用 PRS 和 DNA 清除柱后得到的 RNA
- 2, 4 DNA 清除柱洗脱后的 DNA
- 1% 琼脂糖凝胶 1×TAE 150V 20min
- 1, 2 处理量 100mg 泳道 1 可见有基因组污染
- 3, 4 处理量 50mg 泳道 3 无基因组污染

M 1 2 3 4



- 1 玉米干种子 2 小麦干种子 3 水稻干种子 4 绿豆干种子 5 花生种子 6 葡萄籽 7 土豆块茎
注: 玉米和小麦干种子起始材料为 120mg, 可见有基因组污染; 其余起始材料为 50 mg, 无可见基因组污染。

● 问题指南:

1. 离心柱发生堵塞

离心柱发生堵塞之后会造成 RNA 得率降低甚至不能纯化得到 RNA。

常见原因分析如下:

1.1: 样本破碎不彻底。

样本破碎不彻底会使吸附柱发生堵塞, 同时会影响 RNA 得率及质量。我们建议在进行样本破碎的时候, 在足量的液氮中快速研磨操作, 尽量破碎样本细胞壁、细胞膜等组织。

1.2 样本初始量过多。

样本使用量过多会导致裂解液 RL 或裂解液 RSL 裂解细胞时不完全, 导致离心柱堵塞。RealPure 多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒和 RealPure 植物种子 RNA 提取试剂盒处理样本的初始最大量为 50 mg。

1.3 离心机的温度过低。

整个 RNA 分离纯化除了液氮破碎样本组织外，所有的步骤均在常温（20-25℃）进行。有些低温离心机的温度低于 20℃，可能会造成离心柱的堵塞。如果发生这种现象，请将离心机温度设置到 20-25℃。

2. 提取不到 RNA 或者 RNA 产量低

通常会有多种因素影响回收效率，比如：样本 RNA 含量、操作方法、洗脱体积等。

常见原因分析：

- 2.1 样本保存不当或样本保存时间过久导致 RNA 已经降解。
建议：新采集的样本应立即放入液氮中速冻，长期保存于-70℃并避免样本的反复冻融；或者将样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNAwait 溶液中。
- 2.2 样本破碎裂解不充分导致纯化柱堵塞。
建议：在组织研磨时，请保证组织充分研磨，并在研磨完成后迅速转移至预先准备好的裂解液 RL 或裂解液 RSL（确认已添加正确比例的 β -ME）中。
- 2.3 洗脱液添加不正确。
建议：确认 RNase-Free 水滴加到了纯化柱膜 O 型垫圈中央位置。
- 2.4 漂洗液 RW 中没有添加正确体积的无水乙醇。
建议：请按照说明书，在试剂盒使用前，漂洗液 RW 中添加正确体积的无水乙醇并混匀。
- 2.5 组织样本用量不合适。
建议：每 500 μ l 裂解液 RL 或裂解液 RSL 使用最大组织量 50 mg，组织使用过多会导致 RNA 提取量降低并且得到的 RNA 纯度也会降低。**我们强烈建议每单次 RNA 提取操作，样本初始用量一定不要超过最大建议量。**
- 2.6 洗脱体积不合适或洗脱不彻底。
建议：纯化柱的洗脱液体积为 50-100 μ l；若洗脱效果并不理想，建议在加入 65℃ 预热的 RNase-Free 水后，延长常温放置的时间，例如放置 5-10 min。
- 2.7 纯化柱在第二次 RW 洗涤之后有乙醇残留。
建议：漂洗液 RW 洗涤后，吸附柱空甩离心 2 min 是关键步骤，以充分除去吸附柱上残留的乙醇。
- 2.8 试剂盒使用不正确。
建议：对于多酚多糖的植物样本，务必使用缓冲液 PRS，这是我们专门针对多酚多糖植物样本而研制的多糖多酚去除剂，如不添加，将导致 RNA 不能挂柱或提取到纯度不高的 RNA。

3. 纯化获得的 RNA 有降解

纯化得到的 RNA 的质量和样本的保存、RNase 污染、操作等因素有关。

常见原因分析：

- 3.1 组织样本采集后没有及时保存。
建议：组织样本在收集后若不及时使用，请立即低温保存于液氮中或经液氮速冻后立即转移至-70℃长期保存，或者将样本立即浸泡在 RNA 稳定剂 RNAwait 溶液中。提取 RNA 请尽量使用新近采取的组织样本。
- 3.2 组织样本反复冻融。
建议：组织样本保存时，最好剪成小段保存，使用时取出其中一部分即可，避免样本的反复冻融导致 RNA 的降解。
- 3.3 操作间有 RNase 引入或没有佩戴一次性手套、口罩等。
建议：RNA 提取实验最好在单独的 RNA 操作间进行，并在实验前清理好实验桌，实验时佩戴

一次性手套、口罩，最大程度上避免 RNase 引入导致的 RNA 降解。

3.4 试剂在使用过程中被 RNase 污染。

建议：更换新的植物总 RNA 提取系列试剂盒进行相关实验。

3.5 RNA 操作时所用的离心管、枪头等有 RNase 污染。

建议：确认 RNA 提取时所用到的离心管、枪头、移液器等都是 RNase-Free。

4. RNA 中含有 DNA 污染

4.1 提取的起始材料超过 50 mg

建议：步骤 1-样品处理时用天平称取粉末重量，不要超过 50 mg，否则样品的核酸量会超过 DNA 清除柱 CS 的处理极限，导致洗脱下的 RNA 有基因组 DNA 的污染。

4.2 省略了步骤 3-去除基因组污染步骤。

建议：步骤 3-去除基因组污染步骤必不可少，不能省略。DNA 清除柱 CS 能最大限度的去除上清液中的基因组 DNA，使用裂解液 RL plus 洗脱下的 RNA 基本无基因组 DNA 的污染。

4.3 跳过了使用去蛋白液 RD 的漂洗步骤（见操作步骤第 6 步）。

建议：这一步骤对于除去残留的 DNA 以及杂质蛋白十分重要，一定不能省略，否则将会导致纯化得到的 RNA 中含有 DNA 污染和蛋白污染。

5. 纯化获得的 RNA 影响下游实验

经吸附柱纯化的 RNA，如果盐离子、蛋白质含量过多会影响下游实验，比如：逆转录、Northern Blot 等。

1. 洗脱后的 RNA 有盐离子残留。

建议：确认漂洗液 RW 中添加了正确体积的乙醇，并按操作说明的离心转速进行 2 次 RW 洗涤吸附柱（见操作步骤第 7，8 步）。

2. 洗脱后的 RNA 有乙醇残留。

建议：确认 RW 第二次洗涤后，按操作说明的对吸附柱进行空管离心操作（见操作步骤第 9 步），如果还有乙醇残留，可以将空管离心后吸附柱开盖常温放置 5 min，以最大程度上去除乙醇残留。