

## FastPure Plant RNA Mini Kit Handbook

### FastPure 植物样品 RNA 小量提取试剂盒说明书

#### 产品组成

FastPure Plant RNA Mini Kit			
产品编号	EK-1306-50T	EK-1306-100T	EK-1306-250T
纯化次数	50 次	100 次	250 次
Buffer RLT	40ml	80ml	220ml
Buffer RW1	32ml	64ml	176ml
Buffer RPE	12ml	24ml	60ml
Buffer RDD	4ml	8ml	20ml
RNase-free Water	10ml	20ml	50ml
DNaseI (1500U)	1 支	2 支	5 支
RNase-free 吸附柱	50	100	250
2ml Collection Tubes	50	100	250
使用手册	1	1	1

#### 产品介绍

本试剂盒可以快速地从中植物中提取总 RNA，不含酚氯仿等有毒试剂。其提取的总 RNA 纯度高，无蛋白质及其它杂质污染，可用于 RT-PCR、Real Time RT-PCR、mRNA 差异显示、引物延伸分析、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、Slot Blot、Poly A 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品级化妆品等用途。

#### 存储条件

RNase-free DNase I 和 Buffer RDD 置于 2-8°C 保存；Buffer RLT 可室温（15°C-25°C）干燥放置至少

一年，加入 β-巯基乙醇的 Buffer RLT 可室温放置一个月；其他试剂室温干燥保存可至少稳定 12 个月。

#### 需要额外准备的材料

- 14.3 M β-巯基乙醇(β-ME) (常规购买商业化商品即为 14.3 M)
- 70%乙醇：RNase-free 水配制
- 无水乙醇（96%-100%）
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 无 RNase 酶的吸头
- 干净的手套
- 高速离心机
- 物理研磨设备

#### 开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 操作前在 Buffer RLT 中加入 β-巯基乙醇（β-ME）至终浓度为 1%（建议现配现用），如 1 ml Buffer RLT 中加入 10 μl β-巯基乙醇。配好的 Buffer RLT 可在 4°C 维持稳定一个月。
- Buffer RLT 在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请 37°C 加热溶解后室温使用。
- Buffer RPE 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 4 倍体积的乙醇（96-100%）以获得工作溶液。
- 如果执行可选的柱上 DNA 酶消化步骤，请制备 DNase I 储备液：将 DNase I 干粉（1500 U）溶解在 550 μl RNase-free ddH<sub>2</sub>O 中，轻柔混匀（禁止涡旋），分装后 -20°C 贮存（可保存 9 个月）。
- RNase-free 水中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染，使用时尽量注意，推荐开瓶后分装保存以减少污染风险保证实验稳定性。
- RNA 在 Buffer RLT 中时不会被 RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的离心管或玻璃器皿。
- RNA 提取操作及离心过程常温进行即可。

**操作步骤:**

1. 根据情况使用进行以下步骤研磨最多 100 mg 的植物材料
  - 1a. 立即将组织置于液氮中用研钵和研杵彻底研磨。将组织粉末倒入用液氮提前冷却的无酶 2 ml 离心管中。让液氮蒸发, 但不要使组织解冻。立即继续执行步骤 2。
  - 1b. 组织匀浆处理: 根据相应研磨设备步骤进行, 研磨完成后立即执行步骤 2。
2. 加入 450  $\mu$ l Buffer RLT (使用前请检查 Buffer RLT 是否加入  $\beta$ -巯基乙醇或 DTT) 最多 100 mg 组织粉末中, 大力充分涡旋。
3. 将离心管放入高速离心机中以最大转速( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心 3 分钟。
4. 收集上清并加入新的无酶 1.5ml 离心管中, 同时加入 0.5 倍体积的无水乙醇混匀。不要离心, 混匀后再执行步骤 5。

加入乙醇后可能会形成沉淀为正常现象, 这不会影响后续的操作步骤。如裂解液吸出 400 $\mu$ l 则加入 200 $\mu$ l 无水乙醇混匀。
5. 将步骤 4 混匀后的溶液转移入 RNase-free 吸附柱中并套上 2ml 收集管,  $\geq$ 8000x g ( $\geq$ 10,000rpm) 离心 1min, 弃废液, 直至将溶液全部转移完成吸附。

吸附柱最大上柱量为 700 $\mu$ l, 若溶液过多可分多次上柱。后续操作若无特殊说明吸附柱均置于 2ml 收集管中。
6. (可选步骤) 向吸附柱中央加入 80 $\mu$ l DNase I 工作液, 室温 (15 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C) 静置 15min。配制 DNase I 工作液: 取 10 $\mu$ l DNase I 储备液入新的 RNase-free 离心管中, 并加入 70 $\mu$ l Buffer RDD, 轻柔混匀。

注意: DNase I 对物理变性特别敏感, 所以混匀时请上下倒置轻柔混匀, 切勿涡旋。请确认 DNase I 工作液加入到正中央的柱膜上, 否则 DNase 消化效果会不理想。
7. 向吸附柱中加入 700 $\mu$ l Buffer RW1,  $\geq$ 8000 $\times$ g( $\geq$ 10,000 rpm) 离心 30s, 弃废液。
8. 将吸附柱重收套回收集管中, 向吸附柱中加入 500 $\mu$ l Buffer RPE (使用前请确认 Buffer RPE 按要求加入 4 倍体积无水乙醇),  $\geq$ 8000 $\times$ g( $\geq$ 10,000 rpm) 离心 30s, 弃废液。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 倒弃滤液, 将吸附柱放入收集管中, 以最大转速( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心 3 分钟干燥柱子。

11. 将吸附柱套入新的无酶 1.5ml 离心管管中, 并置于无酶环境中开盖静置 5-10min 至乙醇晾干。

若吸附柱中残留乙醇将会对纯化后的 RNA 的下游实验造成影响。

12. 向吸附柱膜正中央加入 50-100 $\mu$ l RNase-free Water, 盖上盖子室温静置 2-3 min。后置于离心机中最大转速( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心 3min 得到 RNA 溶液。

RNA 洗脱体积不应少于 30 $\mu$ l, 否则影响洗脱效率。洗脱后的 RNA 溶液应立即进行下游实验或置于-80 $^{\circ}$ C 储存。

**常见问题:**

1. 柱子堵塞
  - 样品用量太多: 减少样品用量, 参照说明书中提供用量建议。
  - 样品消化不充分: 用液氮或研磨仪充分研磨, 延长研磨时间。
2. RNA 产量低
  - 试剂准备有误: Buffer RPE 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
  - 洗脱不充分: 洗脱液需加到膜中央, 增加洗脱体积或次数。
3. RNA 降解严重
  - 样品保存有误: 非新鲜现取样品应尽量保存 RNA Holder 等保存液中。
  - 提取过程耗材及环境污染: 提取中使用的吸头、离心管等需经无酶处理, 环境应尽量选择无酶环境或洁净环境以减少 RNase 的影响。