**植物总RNA提取试剂盒**

**（离心柱型）**

**货号：KTSM2903**

**■ 产品简介：**

本产品适用于从各种植物中提取高品质总RNA。本试剂盒配有独特的裂解体系，将RNA从组织中释放出来后在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过去蛋白液和漂洗液将多聚糖、蛋白等杂质去除，最后由RNase-Free Water将RNA从硅基质膜上洗脱下来。本产品提取RNA方便快捷，无需使用氯仿、苯酚等有毒有害化学物质，对操作人员及实验环境无毒害作用。

**■主要成分**：

|  |  |
| --- | --- |
| **产品组成** | **KTSM2903（50次）** |
| 裂解液RG | 30 ml |
| 去蛋白液RD | 16 ml |
| 漂洗液RW | 12 ml |
| RNase-Free-Water | 15 ml |
| DNaseI | 1 ml |
| 10 × DNaseIbuffer | 500 µl |
| RNase-Free吸附柱R1（含2 ml收集管） | 50个 |
| RNase-Free过滤柱RF（含2 ml收集管） | 50个 |
| RNase-Free离心管（1.5 ml） | 50个 |

**■保存条件**：

DNase I，10 × DNase I Buffer置于-20℃保存；其他溶液于室温（15-25℃）保存。

**■自备试剂**：

β-巯基乙醇、无水乙醇。

**■ 注意事项：**

（1）第一次使用前请先在去蛋白液RD和漂洗液RW瓶中加入指定量无水乙醇，并做好标记。

（2）裂解液RG在使用前请加入β-巯基乙醇至终浓度为1%，如1 ml裂解液RG加10 μl β-巯基乙醇。加入β-巯基乙醇的裂解液RG在4℃可保存1个月，如出现沉淀，请加热溶解后使用。DNase I-20℃保存应避免反复冻融。

（3）植物组织裂解是否充分直接影响到RNA提取的质量和产量，本试剂盒中提供的裂解液RG，主要成分为异硫氰酸胍，适用于大多数植物组织的裂解，但不适用于一些次级代谢产物较特殊的植物组织（例如玉米的乳白色胚乳）或丝状真菌。

（4）裂解液RG和去蛋白液RD中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，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）以下操作如非指明，均在室温下进行。

**■ 预防RNase污染：**

（1）全程佩戴一次性手套，经常更换新手套。皮肤经常带有细菌和霉菌，可能污染RNA的抽提并成为RNA酶的来源。培养良好的微生物实验操作习惯预防微生物污染。

（2）使用无RNA酶的非一次性的玻璃器皿或塑料器皿。玻璃器皿可以在150°C的烘箱中烘烤4 h，塑料器皿可以在0.5 M NaOH中浸泡10 min，用水彻底漂洗干净后高压灭菌备用。

**■ 操作步骤：**

1. 匀浆处理：取50-100 mg植物叶片在液氮中迅速研磨成粉末，加入450 μl RG（**使用前请先检查是否已加入1%β-巯基乙醇**），涡旋剧烈震荡混匀。

**注意：**

**（1）在56**℃**孵育1-3 min将有助于植物组织裂解，但是对于某些富含淀粉的样品，请不要加热处理，防止因淀粉引起的样品膨胀现象。**

**（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。**

1. 将所有溶液转移至过滤柱RF上(过滤柱RF放在收集管中)，12,000 rpm离心2 min，小心吸取收集管中的上清至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。

**注意：由于裂解液较粘稠，所以将溶液转移至过滤柱时，可以剪去部分吸头末端。**

1. 缓慢加入0.5倍上清体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱R1中（吸附柱放在收集管中），12,000 rpm离心30 sec，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
2. 向吸附柱R1中加入350 μl去蛋白液RD（**使用前请先检查是否已加入乙醇**），12,000 rpm离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
3. DNase I工作液的配制：往新的RNase-Free 离心管中分别加入20 μlDNase I，8 μl 10 × DNase I Buffer 和52 μlRNase-Free Water，轻柔混匀。
4. 向吸附柱R1中央加入80 μl的DNase I工作液，室温放置15 min。
5. 向吸附柱R1中加入350 μl去蛋白液RD，12,000 rpm离心30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. 向吸附柱R1中加入500 μl漂洗液RW（**使用前请先检查是否已加入乙醇**），室温放置2 min，12,000rpm离心30 sec，倒掉废液，将吸附柱R1放回收集管中。
7. 重复步骤8。
8. 12,000 rpm离心2 min，倒掉废液。将吸附柱R1置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意：此步骤目的是将吸附柱R1中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的RT等实验。**

1. 将吸附柱R1转入一个新的RNase-Free 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100 μl RNase-Free Water，室温放置2 min，12,000 rpm离心2 min，得到RNA溶液。

**注意：洗脱缓冲液体积不应少于30 μl，体积过小影响回收效率。RNA溶液请在-70**℃**保存。**