TaKaRa Code：D325A

RNAiso-mate for Plant Tissue
（植物 Total RNA 提取辅助剂）

说明书

TaKaRa

宝生物工程（大连）有限公司

目　　录

内　容	页　码
●制品说明	1
●制品组成	1
●保存和运输	1
●RNA 提取实验前的准备	1
●实验操作	2
●植物 RNA 提取操作流程图	3
●实验例	4
●Troubleshooting	4

●制品说明

本制品作为RNAiso Plus的辅助试剂，与RNAiso Plus搭配使用，可以高效地从植物材料中提取高纯度的Total RNA。由于本制品中含有高分子聚合物，能够有效地与组织样品中的多糖多酚结合，并可以在之后的离心步骤中除去。因此，本制品对从富含多糖多酚的植物材料中提取Total RNA同样有效。

本制品中不含有苯酚、巯基乙醇等具有刺激性气味的成份，无色无味，使用安全方便。本制品具有很强的广谱性，可以适用于叶片、果实、种子等各种植物材料。对于松针、香蕉、草莓等使用普通方法不能提取Total RNA的植物材料同样可以进行顺利提取。

经本制品处理，再使用 RNAiso Plus 提取得到的 Total RNA 纯度高，不含蛋白质及基因组 DNA，大幅度降低多糖多酚的含量，提取的 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、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验。

●制品组成

RNAiso-mate for Plant Tissue	100 ml

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆ RNAiso Plus（TaKaRa Code：D9108）
- ◆ 氯仿
- ◆ 异丙醇
- ◆ 75%乙醇（DEPC 处理水配制）
- ◆ RNase-free水(制备方法:使用RNase-free的玻璃瓶,向超纯水中加入DEPC至终浓度0.1%(v/v)，过夜搅拌后，高温高压灭菌。)

●保存和运输

1. 可以在室温下保存，若出现白色絮状沉淀，请于 37℃保温，待沉淀完全溶解后使用。
2. 常温运输。

●RNA 提取实验前的准备

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。

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

（2） 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。

●实验操作

1. RNAiso-mate for Plant Tissue 的使用量。

   每提取 100 mg 的样品，RNAiso-mate for Plant Tissue 的使用量为 1 ml，对于一些多糖多酚含量超高的特殊材料，可以适当增加 RNAiso-mate for Plant Tissue 的使用量。

2. 植物样品的研磨和匀浆。

   ① 称量 100 mg 的新鲜或超低温冻结的植物 RNA 提取样品，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）。

   ② 向研钵中加入 1 ml 的 RNAiso-mate for Plant Tissue，将研磨成粉末状的样品完全覆盖，然后室温静置，直至样品完全融化，再用研杵继续研磨至裂解液呈透明状。

   ③ 将匀浆液转移至 1.5 ml 离心管中，12,000 g 4℃离心 5 分钟。

   ④ 小心吸取上清液（切勿吸取沉淀），平均分至 2 个新的 1.5 ml 离心管中，各约 500 μl。

3. Total RNA 的提取。

   ① 分别向上述步骤 2 的匀浆裂解液中加入等体积的 RNAiso Plus，盖紧离心管盖，用力振荡，待溶液充分乳化后（无分相现象），室温静置 5 分钟。

   ② 分别向上述步骤①的混合液中加入 1/5 体积量的氯仿（各约 200 μl），盖紧离心管盖，用手剧烈振荡 15 秒（氯仿沸点低、易挥发，振荡时应小心离心管盖突然弹开），待溶液充分乳化（无分相现象）后，再室温静置 5 分钟。

   ③ 12,000 g 4℃离心 15 分钟。

   ④ 从离心机中小心取出离心管，此时匀浆液分为三层，即：无色的上清液、中间的白色蛋白层及带有颜色的下层有机相。吸取上清液转移至另一新的离心管中（切忌吸出白色中间层）。

   ⑤ 向上清中加入与上清等体积的异丙醇，上下颠倒离心管充分混匀后，在 15～30℃下静置 10 分钟。

   ⑥ 12,000 g 4℃离心 10 分钟。一般在离心后，试管底部会出现沉淀。

4. RNA 沉淀的清洗。

   小心弃去上清，缓慢地沿离心管壁加入 75%的乙醇 1 ml（切勿触及沉淀），轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁，12,000 g 4℃离心 5 分钟后小心弃去乙醇（为了更好地控制 RNA 中的盐离子含量，应尽量除净乙醇）。

5. RNA 的溶解。

   室温干燥沉淀 2～5 分钟（不可以离心或加热干燥，否则 RNA 将会很难溶解，有关 RNA 溶解可以参考 Troubleshooting 中的相关说明），加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀，必要时可用移液枪轻轻吹打沉淀，待 RNA 沉淀完全溶解后于-80℃保存。

●植物 RNA 提取操作流程图

100 mg 的植物组织，液氮研磨

↓ 加入 1 ml 的 RNAiso-mate for Plant Tissue

室温融化，转移至新的 1.5 ml 离心管中

↓ 12,000 g 4℃离心 5 分钟。

小心吸取上清液，平均分至 2 个新的 1.5 ml 离心管中。

↓

分别加入等体积的 RNAiso Plus，各约 500 μl

↓ 振荡混匀

室温静置 5 分钟

↓

分别加入 1/5 RNAiso Plus 体积量的氯仿，各约 200 μl

↓ 振荡混匀

室温静置 5 分钟

↓ 12,000 g 4℃离心 15 分钟

将上清液转移至新的离心管中

↓ 加入与上清液等体积的异丙醇

室温静置 10 分钟

↓ 12,000 g 4℃离心 10 分钟

向沉淀中加入 1 ml 的 75%乙醇清洗沉淀

↓ 12,000 g 4℃离心 5 分钟

弃上清保留沉淀

↓ 干燥

溶解于适量的 DEPC 处理水中

●实验例

使用 RNAiso-mate for Plant Tissue 与 RNAiso Plus 结合从马铃薯块根、松针、香蕉果实、芦荟叶片、芒果果实、银杏果、花生果实、香菇子实体等富含多糖多酚的组织材料中提取了 Total RNA，同时与只使用 RNAiso Plus 试剂进行 Total RNA 提取时的实验进行了对比，电泳结果见图 1。

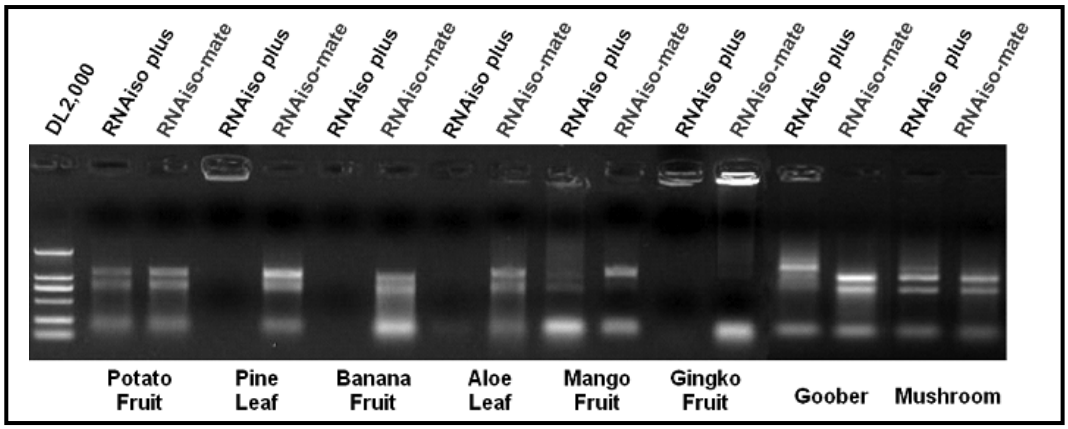

图 1. 富含多糖多酚的组织材料 RNA 提取结果电泳图

●Troubleshooting

1. 一般情况下植物组织中所能提取的 RNA 量如下表：

组织材料	起始样品量	Total RNA提取量
土豆	1 g	约100 μg
松针	1 g	约500 μg
香蕉	1 g	约100 μg
草莓	1 g	约100 μg
烟草叶片	1 g	约1,000 μg

2. 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1.8～2.2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。

OD_{230}/OD_{260}体现了RNA中的盐离子或多糖的污染程度，质量较好的RNA的OD_{230}/OD_{260}值应在0.5左右。存在多糖污染时还会影响OD_{260}的吸收，此时RNA的浓度将不能再根据其计算。

在对核酸进行吸光度检测时，需要注意稀释液应使用TE Buffer。

3. 如何计算RNA的浓度?

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

4. RNA提取量较低怎么办?

① 向组织材料中加入RNAiso-mate for Plant Tissue后，请充分研磨匀浆使其充分裂解。

② 相分离后请尽量完全回收上清液。

③ 部分植物材料水份较大，RNA含量相对较低，提取时请适当加大起始样品量。

5. 提取的 RNA 不溶怎么办?

① 75%乙醇清洗沉淀后不要干燥时间过长或加热干燥。

② 可以于 60℃加热 5 分钟后再于冰上溶解数小时。

③ RNA 沉淀中含有不溶的蛋白质混合物时，应注意在相分离后吸取上清液时，不要让枪头接触蛋白层。

④ 部分样品中仍含有不溶性多糖、蛋白或复合物，可以简单离心除去，大部分 RNA 仍可以保留于上清中。

⑤ 溶解液更换为 0.5%的 SDS 溶液（DEPC 处理水配制）。

6. OD_{260}/OD_{280}值<1.65，为什么?

① RNA 应使用 TE Buffer 稀释后再进行吸光度值的测定,低离子强度或低 pH 值会使 OD_{280}值升高。

② 样品裂解时加入的 RNAiso Plus 量偏少，造成蛋白变性不充分，可以再次对 RNA 溶液进行苯酚/氯仿抽提，以除去蛋白。

③ 含有裂解液的样品经匀浆混匀后未在室温静置，或静置的时间不足 5 分钟。

④ 相分离后，吸取上清液时不小心接触蛋白层造成污染。

⑤ RNA 未充分溶解。

7. OD_{230}/OD_{260}值＞1，为什么?

① 样品中仍残留大量多糖污染，适量增加RNAiso-mate for Plant Tissue的使用量、采用LiCl沉淀的方法或按照下述方法进行:

向裂解液中加入氯仿离心分层后，抽提水相中的RNA，向水相中加入0.25 ml的异丙醇（每使用 1 ml RNAiso Plus），再加入0.25 ml的盐溶液（0.8 M柠檬酸钠，1.2 M氯化钠）轻轻反复颠倒数次混匀。室温静置5分钟后，12,000 g 4℃离心10分钟（替代原来异丙醇沉淀，后续步骤相同）。但此方法会损失大量RNA，导致收量降低，Small RNA的损失尤其严重。

② 溶液中仍残留部分盐离子，在使用 75%乙醇进行洗涤时未清洗干净，或可以再洗涤一次。

8. 提取的 RNA 降解，为什么?

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。

③ 提取的组织材料中含有大量的 RNA 分解酶，适当增加试剂的用量。

9. 提取的RNA中含有DNA污染，为什么?

① 裂解组织或细胞使用的RNAiso Plus量偏少。

② 使用的组织材料中含有大量的有机溶剂（如：乙醇、异丙醇等）、高浓度的Buffer、碱性溶剂等。

③ 如果提取的 RNA 中含有 DNA 时，可以使用 DNase I（RNase Free；TaKaRa Code：D2215）进行 DNA 消化。

10. RNAiso-mate for Plant Tissue 是否可以与其他 RNA 提取试剂搭配使用?

不可以。RNAiso-mate for Plant Tissue 是根据 TaKaRa 的 RNAiso Plus 专门设计的，二者搭配使用可以达到良好效果，大多数使用 RNAiso Plus 无法直接提取的富含多糖多酚的植物材料，配合本试剂使用后均可以提取出高质量的 RNA。本试剂与其它 RNA 提取试剂搭配使用可能会引起 RNA 的降解、收量降低等。

11. RNAiso Plus 可以提取的材料是否可以使用 RNAiso-mate for Plant Tissue 来提高 RNA 的纯度?

如果使用 RNAiso Plus 可以有效提取 RNA 时，就不必再使用 RNAiso-mate for Plant Tissue，RNAiso-mate for Plant Tissue 对富含多糖多酚的植物材料更为有效，对于一般的植物材料，使用 RNAiso-mate for Plant Tissue 处理有时也会适得其反。

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686
8008909508，4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号（116600）

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电　话：　0411-87641681 87641683

传　真：　0411-87619946 87621675

E.mail：　service@takara.com.cn

网　址：　http://www.takara.com.cn

V2010. 02

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂