

TaKaRa Code: D326A

RNAiso for Polysaccharide -rich Plant Tissue

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 提取试验前的准备 | 1 |
| ●注意事项 | 2 |
| ●实验操作 | 2 |
| ●植物组织 RNA 提取操作流程图 | 3 |
| ●实验例 | 4 |
| ●Troubleshooting | 4 |
| ●参考文献 | 5 |

● 制品说明

本制品是一种从富含多糖、多酚的植物材料中提取Total RNA的RNA提取试剂。其原理是利用特殊的渗透方法，使组织材料中的RNA渗透出细胞壁，在这一过程中多糖、多酚类物质基本残留于组织细胞中。此外，由于本制品中含有大量的还原剂，可以避免多酚类物质在提取过程中被氧化而导致RNA的降解。样品在本制品中充分裂解后，加入NaCl和氯仿离心，溶液会形成上清层、中间层和有机层（下层），RNA分布在上清层中。收集上清层后，经异丙醇和高盐溶液沉淀便可以回收得到Total RNA。使用本制品可以从大多数富含多糖多酚的植物材料中提取Total RNA，尤其适用于从马铃薯块茎、香蕉果实、苹果、芒果和松针等复杂材料中提取Total RNA，提取过程方便快捷。

本制品不含有苯酚等挥发性有毒成份，对实验人员毒害性较小。经本制品提取的植物Total RNA纯度高，基本不含多糖多酚等较难分离的杂质，可用于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 for Polysaccharide-rich Plant Tissue | 100 ml |
|---|--------|

【试剂之外所需准备试剂】

- ◆ 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。）
- ◆ 高盐溶液（0.8 M 柠檬酸钠 + 1.2 M NaCl）
- ◆ 5 M NaCl

● 保存和运输

1. 可以在室温下保存。为保证试剂质量，建议于4℃保存。若出现沉淀，请于37℃保温溶解，待恢复至室温后使用。
2. 可以在常温下运输。

● 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。

● 注意事项

本试剂提取的 RNA 中可能会有一定程度的 DNA 污染。可以使用 LiCl 沉淀或 DNase I (RNase Free; TaKaRa Code: D2215) 处理以除去 DNA。

● 实验操作

1. 实验样品的研磨和匀浆。

- ① 将新鲜或超低温冻结的 RNA 提取样品称量后，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 小心将研磨成粉末状的样品全部转移至 1.5 ml 离心管中，每 200 mg 植物材料分一管，每管中加入 1 ml RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue，振荡混匀。
- ③ 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。

2. 总 RNA 的提取。

- ① 向上述上清液中加入 1/5 体积的 5 M NaCl 和 3/5 体积的氯仿。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。
- ② 12,000 g 4℃ 离心 15 分钟。
- ③ 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）。
- ④ 向上清液中加入 1/2 体积的异丙醇和 1/2 体积的高盐溶液，上下颠倒离心管充分混匀后，在室温静置 10 分钟。
- ⑤ 12,000 g 4℃ 离心 10 分钟。一般在离心后，试管底部会出现沉淀。

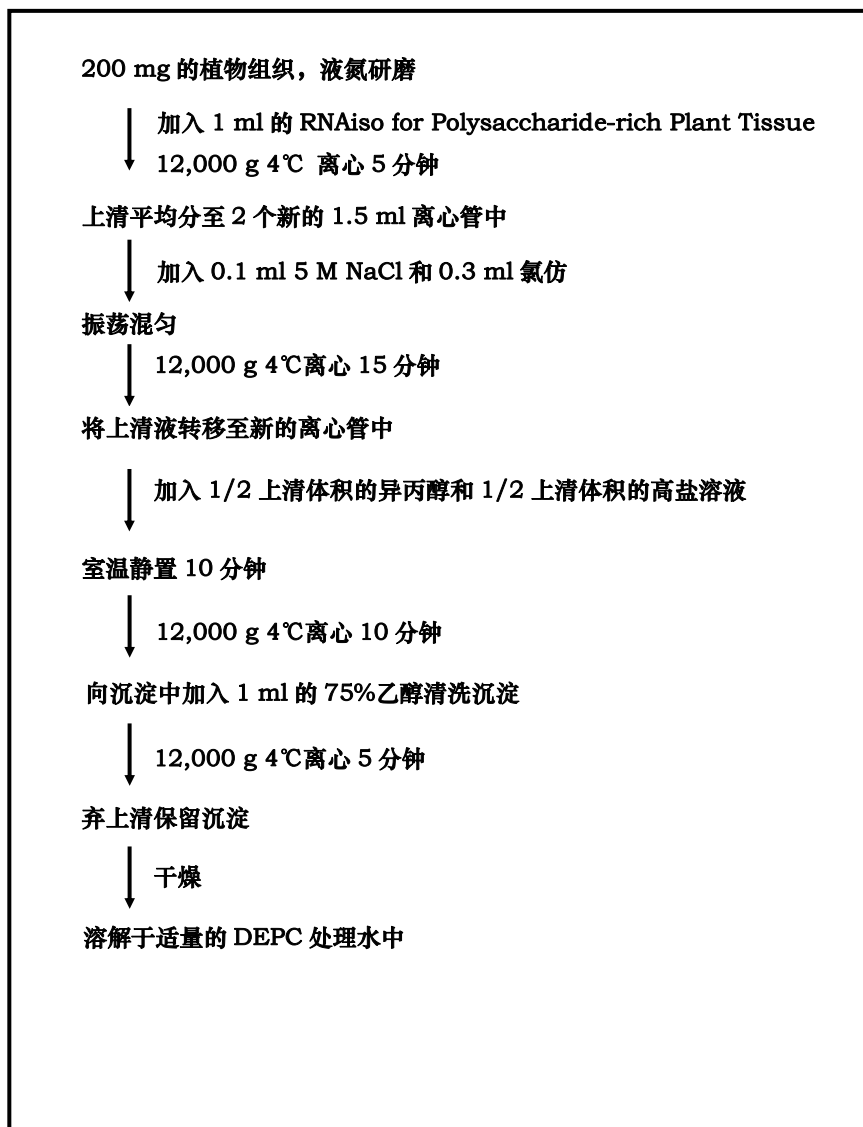
3. RNA 沉淀的清洗。

小心弃去上清，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）。

4. 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。

●植物组织 RNA 提取操作流程图



●实验例

使用本试剂从苹果果实、香蕉果实、松针等富含多糖多酚的组织材料中成功提取了完整度高、纯度好的 Total RNA，同时用 RNAiso Plus (TaKaRa Code: D9108) 进行了对照实验，电泳结果见图 1。

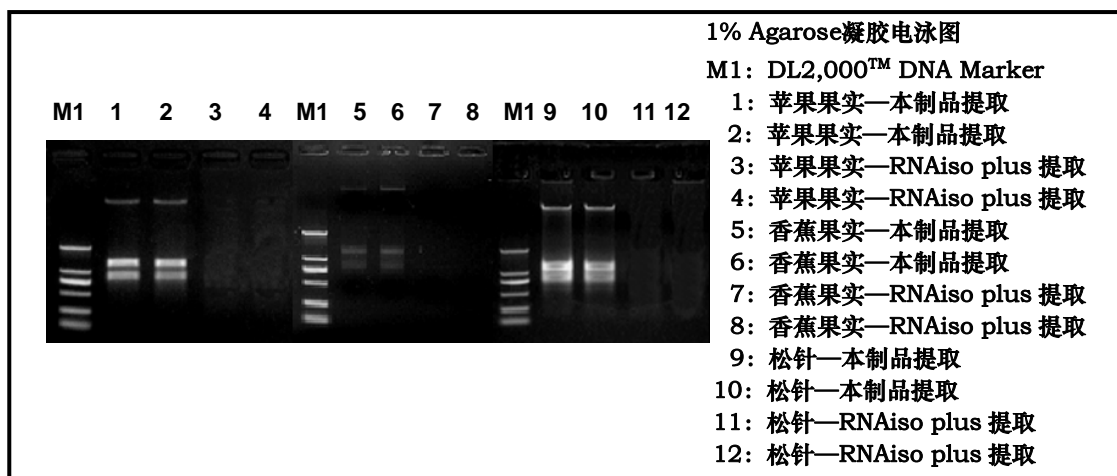


图 1. 富含多糖多酚的组织材料 RNA 提取结果电泳图

●Troubleshooting

1. 一般情况下的植物材料中所能提取的 RNA 量如下表:

| 组织材料 | 起始样品量 | Total RNA提取量 |
|--------|-------|--------------|
| 香蕉 | 1 g | 50 μg |
| 马铃薯 | 1 g | 80 μg |
| 芒果 | 1 g | 10 μg |
| 苹果 | 1 g | 30 μg |
| 松针 | 1 g | 100 μg |
| 香菇 | 1 g | 560 μg |
| 烟草培养细胞 | 1 g | 50 μg |

2. 有关 RNA 的吸光度说明如下:

230 nm、260 nm、280 nm、320 nm 下的吸光度分别代表了盐浓度、核酸、蛋白质等有机物和背景（溶液浑浊度）的吸光度值。OD₂₆₀/OD₂₈₀ (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。

在对核酸进行吸光度检测时，需要注意稀释溶液应使用 TE Buffer。

3. 如何计算 RNA 的浓度?

RNA 浓度 = (OD₂₆₀ - OD₃₂₀) × 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 for Polysaccharide-rich 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. OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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 OD₂₈₀ 值升高。
 - ② 样品裂解时加入的 RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 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. 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, 而 RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 的添加量不够。
8. 提取的RNA中含有DNA污染, 怎么办?

本试剂提取的 RNA 中可能会有一定程度的 DNA 污染。可以使用 LiCl 沉淀或 DNase I (RNase Free; TaKaRa Code: D2215) 处理以除去 DNA。
9. RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 是否适用于所有植物材料的 RNA 提取?

由于植物材料的复杂性和多样性, 影响 RNA 提取的因素较多, 所以各种提取试剂以及方法都有一定范围的适用性。本试剂只适用于富含多糖、多酚植物材料 RNA 的提取, 如马铃薯块茎、香蕉果实、苹果、芒果和松针等, 并不适用于一般的动植物材料。对于一般的动植材料应优先考虑使用 RNAiso Plus (TaKaRa code: D9108) 进行提取。若由于材料中富含多糖多酚而不能有效提取时, 再考虑使用 RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 进行提取。若仍不能有效提取, 可以再根据提取材料的具体情况进行优化。

●参考文献

1. Suzuki Y, Hibino T, Kawazu T, et al. Extraction of Total RNA from Leaves of Eucalyptus and Other Woody and Herbaceous Plants Using Sodium Isoascorbate. *BioTechniques*. 2003, 34: 988-993
2. Gao JW, Liu JZ, Li B, et al. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2001, 19:185a - 185i.

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>

V2010.09

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