

# R6837 HP Plant RNA Kit

## 简易中文步骤

√实验前请按说明书正确稀释 RNA Wash Buffer II.

➤ 使用【无水乙醇】对 RNA Wash Buffer II 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
R6837-00	8mL
R6837-01	48mL
R6837-02	48mL (每瓶)

### E.Z.N.A. HP Plant RNA Kit Protocol

1. 植物叶片经液氮研磨后，收集 $\leq 100\text{mg}$  植物样品至离心管，加入 500 $\mu\text{l}$  Buffer RA，马上涡旋混匀；我们建议可从 50mg 植物组织样品起进行预实验，如预实验纯度符合预期再提高起始样品使用量，可有效防止因样品量过大而导致终产物纯度、质量降低。加入 Buffer RA 前，请尽量避免植物样品冻融。加入 Buffer RA 后，立即彻底涡旋使植物样品与裂解液充分混合，能有效抑制 RNA 的降解；
2. 加入 150 $\mu\text{l}$  水饱和酚与 100 $\mu\text{l}$  氯仿，剧烈上下震荡 15s；
3. 室温 14,000xg 离心 5min；
4. 转移上清液至新的 2mL 无酶离心管内，加入与上清等体积的 Buffer RC，涡旋混匀；
5. 将 gDNA Filter Column 套入 2mL 收集管中，转移上清液至 gDNA Filter Column，室温 14,000xg 离心 2min；
6. 取滤液，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，用枪吸打 5-10 次；
7. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入 2mL 收集管中，将步骤 6 的混合液转移至 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 中，室温 10,000xg 离心 1min，弃滤液；

Note: 要确保裂解液完全过柱，如有残留，可以离心 3-5min 使裂解液完全过柱。

(选做)：如果需要进行 DNase I 消化，可在此步骤后进行，具体操作见后文。

8. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入同一 2mL 收集管中，加 400 $\mu\text{l}$  RWC Wash Buffer，室温 10,000xg 离心 1min，弃滤液；
9. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入同一 2mL 收集管中，加 500 $\mu\text{l}$  RNA Wash Buffer II (提前使用无水乙醇稀释)，室温 10,000xg 离心 1min，弃滤液；

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

10. 再次将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入同一 2mL 收集管中，加 500 $\mu\text{l}$  RNA Wash Buffer II (提前使用无水乙醇稀释)，室温 10,000xg 离心 1min，弃滤液；
11. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入同一 2mL 收集管中，室温 10,000xg 离心

2min, 甩干 HiBind® RNA Mini column 基质;

12. 将 HiBind® RNA Mini column 套在一个新的 1.5mL 离心管中, 取 30-50µl DEPC water, 准确添加在 HiBind® RNA Mini column 膜中央, 室温放置 2min, 10,000xg 室温离心 1min, 洗脱 RNA;

备注: 二次洗脱可增加洗脱效率, 二次洗脱具体操作办法: 把第一次洗脱获得的滤液产物重新吸回柱子, 室温静置 2min, 10,000×g 室温离心 1min, 洗脱 RNA。

Note: 可以用更多的水将 RNA 洗脱。增加额外的洗脱可以增加总 RNA 的产量, 但会导致浓度降低。一次洗脱可回收 80% 的 RNA。目前还没有将基因组 DNA 完全去除的 RNA 提取方法, 对于较敏感的实验 (如 RT-PCR 或差异显示), 建议使用不含 RNase 的 DNase 酶处理洗脱 RNA。同样对于 RT-PCR, 使用内含子跨越引物, 跨越轻松识别 DNA 污染, 含有 RNA 作为模板的对照 PCR 反应也可以检测 DNA 污染。

#### (选做) DNase I 消化

1. 按照前面步骤 1-7 进行直至所有样品混合液转移过柱, 按以下方案进行:
  - A. 加入 300µl RWC Wash Buffer 到柱子中, 10,000xg 离心 1min;
  - B. 对于每个 HiBind® RNA column, 按照以下方法配制 DNase I 消化反应混合液:

组分	加入量
OBI DNase I Digestion Buffer	73.5µl
RNase-free DNase I (20 Kunitz unites/il)	1.5µl
总体积	75µl

Note:

1) DNase I 对物理变性非常敏感, 因此不要涡旋 DNase I 混合液。可以通过倒置管轻轻混合。在 RNA 分离之前准备新鲜的 DNase I 消化混合液。

2) OBI DNase I Digestion Buffer 配有 OBI RNase-free Dnase 装置。

3) 标准 DNase Buffer 与膜上 DNase 消化不相容。

- C. 将 75µl DNase I 消化反应混合液直接转移到柱子中, 确保将 DNase I 消化混合液直接加入到柱子膜上, 如果混合液加到柱子壁上或 O 形环上, DNase I 的消化将无法完成;

- D. 室温 (25°C-30°C) 孵育 15min;

2. 将柱子套入到新的 2mL 收集管中, 加入 400 $\mu$ l RWC Wash Buffer, 室温静置 2min, 10,000xg 离心 1min, 弃滤液;
3. 将柱子套回到 2mL 收集管中, 加入 500 $\mu$ l RNA Wash Buffer II (已加无水乙醇稀释), 按上述条件离心, 弃滤液;

Note: RNA Wash Buffer II 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

4. 重复步骤 3, 加入 500 $\mu$ l RNA Wash Buffer II 进行二次洗涤;
5. 将柱子套入到 2mL 收集管中, 10,000xg 空柱子离心 2min 干燥, 弃收集管;
6. 将柱子套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-50 $\mu$ l DEPC water 洗脱 RNA, 室温静置 1min, 10,000xg 离心 1min 洗脱 RNA, 如有需要再次洗脱 RNA 产量可 > 30 $\mu$ g。

另外, 也可以用更大体积的 DEPC water 来洗脱 RNA, 增加额外的洗脱可增加总 RNA 的产量, 但会使浓度降低, 经一次洗脱可回收到 80% 的 RNA。将 DEPC water 在 70 $^{\circ}$ C 预热后再加入柱子中, 在室温下孵育 5min, 再离心洗脱, 可提高产量。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准