

M5 Plant RNeasy Complex Mini Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Plant RNeasy Complex Mini Kit	50T	MF045-01
M5 Plant RNeasy Complex Mini Kit	200T	MF045-04

【储存条件】

室温储存 12 个月不影响使用效果。本试剂盒所有溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，可在 37℃ 水浴加热几分钟，恢复澄清后再使用。

【产品简介】

在本公司 M5 Plant RNeasy mini kit 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术基础上，又独家研发的基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化，可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，离心沉淀去除多糖多酚和次级代谢产物，然后裂解混合物用乙醇调节 RNA 结合吸附到基因组 DNA 清除柱，然后 RNA 被选择性洗脱滤过，吸附在基因组 DNA 清除柱上的残留 DNA 无法洗脱连同柱子一起丢弃从而清除掉 DNA。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

【产品特色】

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用 Whatman 特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 不需要苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀，快速方便，一般可在 25-30 分钟内完成。
3. 应用性极广，可以提取包括复杂中草药如石斛/丹参/雪莲/人参、复杂淀粉种子如水稻/小麦/玉米种子、复杂果实如葡萄/蓝莓/草莓/西瓜果实、复杂抗逆植物如冬青/松针/沙棘/胡杨、复杂花卉月季/玫瑰/梅/牡丹花、复杂多糖植物紫菜/仙人掌/芦荟水稻种子等数百种样品。
4. 独家研发成功基因组 DNA 清除柱技术可以有效清除 gDNA 残留，得到的 RNA 一般不需要 DNase 消化，可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
5. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.0-2.2，基本无 DNA 残留，可用于 RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

【产品组份】

	50T	注意事项
裂解液 CLB	50ml	室温密闭干燥保存
裂解液 RLT Plus	25ml	室温密闭干燥保存
去蛋白液 RW1	40ml	室温密闭干燥保存
漂洗液 RW	10ml	初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇
RNase-Free H ₂ O	10ml	室温密闭干燥保存
基因组 DNA 清除套管	50 套	室温密闭干燥保存
RNase-Free 吸附套管(RA)	50 套	室温密闭干燥保存

【注意事项】

1. 所有的离心步骤均在室温完成（4℃ 离心也可以），使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 需要自备β-巯基乙醇、乙醇（尽量新开封或者 RNA 专用），研钵。
3. 裂解液 CLB、RLTplus 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，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。
4. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
5. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：
 - 1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染。
 - 2) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - 3) RNA 在裂解液 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 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可

在 150°C 烘烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟, 然后用水彻底清洗, 再灭菌, 即可去除 RNase。

4) 配制溶液应使用无 RNase 的水。(将水加入到干净的玻璃瓶中, 加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v), 37°C 放置过夜, 高压灭菌。)

6. 关于 DNA 的微量残留:

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留, 本产品采取了独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜, 在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留(一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见)影响不是很大, 如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR, 我们建议在进行模板和引物的选择时:

1) 选用跨内含子的引物, 以穿过 mRNA 中的连接区, 这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。

2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。

3) 将 RNA 提取物用 RNase-Free 的 DNase I 处理。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(cleanup), 请联系我们索取具体操作说明书。

4) 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前, 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。请联系我们索取具体操作说明书。

【操作步骤】

<实验前请先阅读注意事项, 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量的无水乙醇!>

实验前准备: 取 1ml 裂解液 CLB 至离心管内 (如果 CLB 有析出或者沉淀需先置于 65°C 水浴重新溶解), 在裂解液 CLB 中加入 5% β -巯基乙醇 (1ml CLB 加 50 μ l β -巯基乙醇)。颠倒混匀后 65°C 水浴中预热。多个样品按照比例放大准备。

1. 直接研磨法 (实验室无液氮情况下或者柔软易研磨植物样品推荐此法):

a. 新鲜植物组织或者冰冻保存样品称重后取 100-200mg (水分少的样品如叶片种子等可加 100-150mg, 水分多的样品如草莓西瓜果实可多加一些) 迅速剪成小块放入研钵, 加入 1ml CLB (已加有 β -巯基乙醇) 室温下充分研磨成匀浆, 注意应该迅速研磨让组织和裂解液 CLB 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

< β -巯基乙醇是裂解液 CLB 的关键成分, 必要的时候可以提终浓度到 10-20%。如果特别复杂植物, 可以尝试在裂解液中加入 PVP40 至终浓度 2%>。

b. 将裂解物转入离心管, 立即剧烈振荡 15 秒, 短时放回 65°C 水浴中 (5-10 min), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。13,000rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。

c. 取裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇 (0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

<若上清表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面液体即可>。

d. 立刻接操作步骤的步骤 3。

2. 液氮研磨法 (适用广泛, 提取复杂难破碎, 易降解样品时推荐此法):

a. 液氮中研磨新鲜或 -70°C 冷冻的材料至细粉。

b. 转移 100-200mg 细粉 (水分少的样品如叶片种子等可加 100-150mg, 水分多的样品如草莓西瓜果实可多加一些) 加至预热的裂解液 CLB (已加有 β -巯基乙醇) 离心管中。立即剧烈涡旋 30-60 秒或者用吸头吹打混匀裂解直得到满意匀浆结果 (或者电动匀浆 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。

c. 短时放回 65°C 水浴中 (5-10 min), 中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。

d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片。

e. 取裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇 (0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

<若上清表面有漂浮物, 用吸头挑开吸取下面液体即可>。

f. 立刻接操作步骤的步骤 3。

3. 将混合物 (每次小于 720 μ l, 多可以分两次加入) 加入一个基因组清除柱中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。

<确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间>。

4. 将基因组 DNA 清除柱子放在一个干净 2ml 离心管内 (不用 RNase free 或者 DEPC 处理, 一般干净的新离心管即可。也可使用 RNA 吸附柱配套的新的干净收集管), 在基因组清除柱内加 500 μ l 裂解液 RLT Plus, 13,000 rpm 离心 30 秒, 收集滤液 (RNA 在滤液中), 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (通常为 450-500 μ l 左右, 滤过时候损失体积应该减去), 加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

5. 立刻将混合物 (每次小于 720 μ l, 多可以分两次加入) 加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。

<确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间>。

6. 加 700μl 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
7. 加入 500μl 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇！），13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500μl 漂洗液 RW，重复一遍。
8. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
9. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50μl RNase-Free H₂O（事先在 70℃ 水浴中加热可提高产量），室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。
10. 如果预期 RNA 产量>30μg，加 30-50μl RNase-Free H₂O 重复步骤 9，合并两次洗液，或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。
<洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高,分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15 - 30%,但是浓度要低,用户根据需要选择>。

【DNA 酶柱消化】

（详细请参考 DNase I 柱上消化试剂盒说明书）

1. 按照前面所列 MF045 试剂盒操作步骤操作，直到做完操作步骤 5。
2. 取 45μl DNase I buffer 和 5μl RNase-Free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液（处理多个离心柱子，要按照比例放大制备工作液）。
3. 向吸附柱 RA 中加入 350μl 去蛋白液 RW1，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
4. 向吸附柱 RA 中央加入 50μl 的 DNase I 工作液，室温（20-30℃）放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上向膜四周浸润充分和膜接触，不要让工作液滴在 O 型垫圈或是离心柱管壁上挂壁或者挂在垫圈上不能充分和膜接触。
5. 向吸附柱 RA 中加入 350μl 去蛋白液 RW1，12,000 rpm 离心 30-60 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. 接操作步骤 7 完成后续步骤。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。