**植物RNA核酸免提取试剂盒（多糖多酚类）**

**试剂盒应用**

本试剂盒采用专门针对多糖多酚类植物样本开发的裂解液PP，在10分钟内完成植物叶片、根、茎、花蕊、种子等的裂解、提取和纯化。提取对象包括棉花、马铃薯、铁皮石斛等。整个提取无需使用蛋白酶K等酶类制剂。该配方中含有RNA保护剂，能够抑制RNA降解、保护RNA完整，从而提高产量。提取RNA可用于RT-PCR、RT-qPCR、Northern Blot、分子克隆、文库构建等。

本试剂盒仅供研究使用，不可用于临床、食品、化妆品等领域。

**试剂盒组成**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组分** | **Col-R0202（50T）** | **编号** |
| 裂解液PP | 35 mL | Col-R0202A |
| 洗涤液PWA | 25 mL | Col-R0202B |
| 洗涤液PWB | 12 mL | Col-R0202C |
| 洗脱液P | 5 mL |  |
| RNA吸附柱 | 50套 | Col-R0202E |

**备注：第一次使用前，在洗涤液PWB中加入48mL无水乙醇，并标记“√”和时间，避免重复加入。**

**保存条件**

室温保存一年。

**自备材料**

水浴锅或金属浴、无水乙醇、1.5mL无RNase离心管、β-巯基乙醇、DNase I（2U/μL，或货号QR0102）

**使用方法**

1. 20-100mg新鲜植物样本经过液氮研磨后，加入700μL裂解液PP和35μLβ-巯基乙醇，涡旋30秒。
2. 55℃孵育1分钟。

备注：淀粉含量高的样本直接进行步骤3。

1. 12,000rpm离心1分钟，吸取500μL上清液。
2. 加入250μL无水乙醇，上下颠倒混匀。
3. 全部加入RNA吸附柱中，12,000rpm离心1分钟，倒掉收集管中废液。
4. 向RNA吸附柱中加入500μL洗涤液PWA，12,000rpm离心30秒，倒掉收集管中废液。
5. 向RNA吸附柱中加入500μL洗涤液PWB，12,000rpm离心30秒，倒掉收集管中废液。
6. 重复步骤7一次。
7. 12,000rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。
8. 将RNA吸附柱放入新1.5mL无RNase离心管，加入30-50μL 洗脱液P，室温放置1分钟。
9. 12,000rpm离心2分钟，得到RNA溶液，-80℃保存。

**注意事项**

1. 务必在超净台中进行操作，常换手套，防止RNA降解。
2. 尽可能使用新鲜样本进行RNA提取。
3. 使用无DNase无RNase的吸头和离心管，防止RNA降解，常更换吸头，防止交叉污染。
4. 为了提高洗脱效率，可提前将洗脱液PP置于65℃水浴后再使用。
5. 根据后续试验需求，请使用DNase I（货号QR0102）进行基因组清除。

**常见问题解析**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **问题** | **可能原因** | **推荐解决方案** |
| RNA吸附柱  堵塞 | 1. 上样量太高 2. 加入RNA吸附柱的液体中有固体成分或沉淀物 | 1. 减少上样量。 2. 增加离心时间。 3. 切勿吸取到可见固体成分。 4. 再次离心。 |
| RNA得率低 | 1. 未离心下来 2. 样本量太大，裂解不充分 | 1. 减少样本量。 2. 重复洗脱步骤一次。 |
| RNA降解 | 1. 样本不新鲜 2. RNA酶污染 | 1. 使用新鲜样本。 2. 使用保存在样品保存液中样本。 3. 样本保存在-80℃甚至液氮中，尽可能现取现用。 4. 常更换手套。 5. 常更换吸头和离心管。 6. 使用无DNase无RNase的吸头和离心管。 |