

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Polysaccharide polyphenols/complex plant RNA kit

多糖多酚/复杂植物RNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC0307

01/产品组分

序号	组分	50次 AC0307
1	裂解液 CLB	50 mL
2	裂解液 RLT	25 mL
3	去蛋白液 RW1	36 mL 第一次使用前加入 4 mL 无水乙醇
4	漂洗液 RW	13 mL 第一次使用前加入 52 mL 无水乙醇
5	RNase Free H ₂ O	10 mL
6	基因组 DNA 清除柱 和收集管	50 套
7	RNase Free 吸附柱 RA 和收集管	50 套
8	RNase-Free 收集管 (1.5 mL)	50 个

02/保存条件

本试剂盒所有组分室温 (15-25°C) 保存。

03/产品概述

该产品基于 SPARKeasy 无苯酚、氯仿 RNA 快速提取技术, 以及基因组 DNA 清除柱技术 (而非 DNase 消化), 确保有效清除 gDNA 残留, 得到的 RNA 可直接用于 PCR、荧光定量 PCR 等实验。

该试剂盒内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 结合到基因组 DNA 清除柱上, RNA 被选择性洗脱滤过, DNA 吸附在基因组 DNA 清除柱上而被清除。然后用乙醇调节结合条件后, 总 RNA 在高离子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去蛋白、漂洗的步骤将细胞代谢物、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。该产品可在 50 min 内完成样品 RNA 的提取, 提取的总

RNA 完整性好，无蛋白和基因组 DNA 污染。

不同样本提取 RNA 的大致产量与纯度如下：

样本类型	样本量	RNA 平均产量	纯度
香蕉果肉	100 mg	3-5 μg	1.8-2.0
西瓜果肉	100 mg	1.5-2.4 μg	1.8-2.0
苹果、梨果肉	100 mg	1.2-2 μg	1.8-2.0
红薯块茎	100 mg	5.5-9 μg	1.8-2.0
马铃薯块茎	100 mg	6-10 μg	1.8-2.0
白松松针	100 mg	15-20 μg	1.8-2.0
棉花叶片	100 mg	20-25 μg	1.8-2.0
月季叶片	100 mg	20-25 μg	1.8-2.0
枇杷叶片	100 mg	8-10 μg	1.8-2.0
水稻叶片	100 mg	20-25 μg	1.8-2.0

04/自备材料

β -巯基乙醇、无水乙醇

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量无水乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- ◇ 裂解液 CLB、裂解液 RLT 和去蛋白液 RW1 中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，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。
- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25°C）下进行。
- ◇ 取 1 mL 裂解液 CLB 至离心管内（如果裂解液 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（1 mL 裂解液 CLB 加 50 μL 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。

06/使用方案

1. 样品处理：

◆ 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 50 mg-100 mg（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 1 mL 裂解液 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，必要的时候可以升高终浓度到 10-20%。

- b. 将裂解物转入离心管，立即剧烈振荡 15 s，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。12,500 rpm（14,500×g）离心 10 min，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 倍体积），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 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 50 mg-100 mg 细粉（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 s 或者用移液器吹打混匀裂解至得到满意匀浆结果（或者电动匀浆 30 s），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 12,500 rpm（14,500×g）离心 10 min，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 倍体积），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 2。
2. 将混合物（每次小于 720 μL，多可以分两次加入）加入一个基因组清除柱中，（清除柱放入收集管中）12,500 rpm（14,500×g）离心 2 min，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。
 3. 将基因组 DNA 清除柱放在一个干净 2 mL 离心管内（不用 RNase Free 或者 DEPC 处理，一般干净的新离心管即可），在基因组清除柱内加 500 μL 裂解液 RLT，12,500 rpm（14,500×g）离心 30 s，收集滤液（RNA 在滤液中），用移液器较精确估计滤过液体积（通常为 450-500 μL 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。
 4. 立刻将混合物（每次小于 720 μL，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）12,500 rpm（14,500×g）离心 2 min，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。
 5. 加 700 μL 去蛋白液 RW1，室温放置 1 min，12,500 rpm（14,500×g）离心 30 s，弃掉废液。
 6. 加入 500 μL 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,500 rpm（14,500×g）离心 30 s，弃掉废液。加入 500 μL 漂洗液 RW，重复一遍。
 7. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm（14,500×g）离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

8. 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30-50 μL RNase Free H_2O （事先在70-90°C水浴中加热可提高产量），室温放置1 min，12,000 rpm（13,400 \times g）离心1 min。
9. 如果预期RNA产量>30 μg ，加30-50 μL RNase Free H_2O 重复步骤8，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）。
 - ▲使用第一次洗脱液重复洗脱两遍的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。

附录 1: DNA 酶柱上消化（详细请参考 AC1710 DNase I 柱上消化试剂盒说明书）

1. 按照前面所列AC0307试剂盒操作步骤操作，直到做完操作步骤4。
2. 取45 μL DNase I buffer和5 μL 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350 μL 去蛋白液RW1，12,000 rpm（13,400 \times g）离心30 s，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
4. 向吸附柱RA中央加入50 μL 的DNase I工作液，室温（15-25°C）放置15 min。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350 μL 去蛋白液RW1，12,000 rpm（13,400 \times g）离心30-60 s，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. 接着做操作步骤6，并完成后续所有步骤。

07/流程简图



08/相关产品

AC0101 SparkZol Reagent

AC0305 SPARKeasy 新型植物RNA快速提取试剂盒

AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit (With gDNA Eraser)

AG0305 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR (With gDNA Eraser)

AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix (With ROX)

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

