

EASYspin Plant RNA Kit

EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒

目录号: RN09

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次(RN0902)
裂解液 RLT	室温	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	40 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
PLANTaid	室温	5 ml
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 不合适的储存于低温（4℃或者-20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃-25℃）进行。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍:

独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，植物 RNA 助提剂 PLANTaid 帮助结合多糖多酚并通过离心去除，然后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。

❖ 产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 简捷，单个样品操作一般可在 25 分钟内完成，世界上最简单快速的试剂盒。
3. 独有的植物 RNA 助提剂 PlantAid 可以有效结合多糖多酚，提高清除效果。
4. 世界领先适应性极其广泛，可以提取包括棉花、松针、冬青树叶、葡萄叶片、等 100 多种国内外试剂盒提取失败的样品。详细样品列表请参考公司主页产品介绍。
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。

❖ 注意事项

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机。
2. 需要自备乙醇，研钵(可选)。
3. 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。**

4. 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，本公司的 EASYspin 系列 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜已经清除了绝大部分的DNA 残留，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留影响不是很大，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柱上消化处理。购买DNA酶柱上消化试剂盒(货号: RN34)前可先索取具体操作说明书。
5. 关于复杂植物样品提取残留较多DNA的情况有两个选项:
 - 1) 在步骤去蛋白液RW1漂洗前，直接在吸附柱RA上进行DNase I柱上消化处理。购买DNA酶柱上消化试剂盒(货号: RN34)前可先索取具体操作说明书。
 - 2) 部分较复杂的植物样品提取时，可能残留较多DNA，可以尝试本公司的RN38

EASYspin Plus植物RNA提取试剂盒。RN38在RN09 EASYspin植物RNA提取试剂盒基础上，又独家研发成功基因组DNA清除柱技术可以有效清除DNA残留，在大多数情况下，可以将DNA残留清除到紫外下观测不可见。

6. 关于特别复杂难提取植物样品提取失败或者产量低的情况：

一些特别复杂的植物样品提取，如葡萄果实，蓝靛果果实等，RN09 裂解液RLT无法提取，需选择RN53 EASYspin Plus多糖多酚/复杂植物RNA提取试剂盒。一些样品产量较低，也可以尝试RN53 EASYspin Plus多糖多酚/复杂植物RNA提取试剂盒。RN53配有强力裂解液CLB选项，在很多情况下，可以提取复杂样品或者明显提高产量（详情请看RN53说明书）。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

提示：

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量无水乙醇！

1. 直接研磨法（推荐）：

a. 新鲜植物组织称重后取 100mg 迅速剪成小块放入研钵（冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 100mg 放入研钵），加入 **10 体积（1ml）RLT 和 1 体积（100 μ l）PLANTaid 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 RLT 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

注：PLANTaid 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富的困难样品不可缺少成分。

b. 将裂解物转入离心管，剧烈摇晃振荡 15 秒，13,000rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTaid。

c. 取 **480 μ l 裂解物上清（在不超过 RNA 吸附柱能力的情况下可以取更多或者全部上清，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。

d. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

2. 液氮研磨法（提取复杂，易降解样品时推荐此法）：

a. 取 500 μ l 裂解液 RLT，转入 1.5ml 离心管中，加入 50 μ l PLANTaid 混匀备用。

- b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后，取 50mg 细粉转入上述装有 RLT 和 PLANTaid 的离心管，立即用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。
- c. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTaid。
- e. 取裂解物上清(在不超过 RNA 吸附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。
- f. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

注意：以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理，可以提高产量。也就是使用 1ml 的裂解液 RLT 和 100 μ l PLANTaid 和 100mg 的样品。

- 3. 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。

- 4. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1，室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
- 5. 加入 500 μ l 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 500 μ l 漂洗液 RW，重复一遍。
- 6. 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。
- 7. 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 μ l RNase free water(事先在 70-90 $^{\circ}$ C 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。
- 8. 如果预期 RNA 产量>30 μ g，加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 7，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 RNA 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 RN34 DNase I 柱上消化试剂盒说明书)

1. 按照前面所列 RN09 试剂盒操作步骤操作, 直到做完操作步骤 3。
2. 取 45 μ l DNase I buffer 和 5 μ l 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 μ l 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 50 μ l 的 DNase I 工作液, 室温 (20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C) 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 350 μ l 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 5 完成后续步骤。

附录 2: 使用 EASYspin/EASYspin Plus 系列植物 RNA 快速提取试剂盒发表的部分文章 100 多篇:

1. 桃果实、花、根、叶: Isolation, characterisation and phylogenetic analysis of resistance gene analogues in a wild species of peach (*Prunus kansuensis*). *Canadian Journal of Plant Science*, 2011, 91(6): 961-970
2. 櫻桃花、叶、萼等各部位: Over-expression of the PaAP1 gene from sweet cherry (*Prunus avium* L.) causes early flower. *Journal of Plant Physiology*, 2012, Available online 1 December 2012
3. 洋葱根、茎、蕾、叶、雌雄蕊等各部位: Cloning and Expression Analysis of A Putative B Class MADS-box Gene of AcPI in Onion. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(23):4759-4769
4. 芜菁: Isolation and Functional Characterisation of the Genes Encoding Δ 8-Sphingolipid Desaturase from *Brassica rapa*. *Journal of Genetics and Genomics* Volume 39, Issue 1, January 2012, Pages 47-59
5. 芜菁 1: EXPRESSION, DIVERGENCE AND EVOLUTION OF THE CALEOSIN GENE FAMILY IN *BRASSICA RAPA*. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 65 (3), 863-876, 2013 DOI:10.2298/ABS1303863H
6. 番茄叶: Effect of Low Temperature Stress on the Expression of ProDH Gene and the Activities of the Proline Dehydrogenase in Leaves of Tomato Seedling. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 2012,28(10):132-135
7. 梔子叶: Isolation of High Quality Total RNA from *Gardenia jasminoides* Eills. *Chinese Agricultural Science Bulletin*.2012, 28(27):194-198
8. 油桐果实: Cui Qinqin, Han Xiaojiao, Chen Yicun, Zhan Zhiyong, Lin Liyuan, Wang Yangdong. Isolation and Expression Characteristics of Biotin Carboxyl Carrier Protein Coding

- Gene (VfBCCP) from *Vernicia fordii*. SCIENTIA SILVAE SINICAE. 2012, 48(8): Available online August
9. 油桐果实 1: Selection of Reliable Reference Genes for Gene Expression Studies Using Real-Time PCR in Tung Tree during Seed Development. PLoS ONE, 2012, 7(8): e43084
 10. 紫菜: Molecular cloning and expression analysis of ribosomal protein S7 gene from *Porphyra haitanensis*. JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA, 2011, 35 (12): 1814-1821
 11. 石斛: Molecular characterization of a mitogen-activated protein kinase gene DoMPK1 in *Dendrobium officinale*. Acta Pharmaceutica Sinica, 2012, 47 (12): 1703-1709
 12. 石斛 1: ESTs Analysis Reveals Putative Genes Involved in Symbiotic Seed Germination in *Dendrobium officinale*. Symbiotic Germination Genes in *D. officinale*. August 2013 | Volume 8 | Issue 8 | e72705
 13. 大豆: RNA-seq Analysis Reveals Ethylene-Mediated Reproductive Organ Development and Abscission in Soybean (*Glycine max* L. Merr.). Plant Mol Biol Rep, 2012, published online: 4 Dec, 2012
 14. 大豆 1: Construction of ethylene regulatory network based on the phytohormones related gene transcriptome profiling and prediction of transcription factor activities in soybean. Acta Physiol Plant, 2012, published online: 12 Dec, 2012
 15. 红花玉兰: Expression Analysis of MAwuAG in Different Organs and Developmental Stages of *Magnolia wufengensis*. Chinese Bulletin of Botany, 2013, 48 (2): 1-5
 16. 毛桃: Cloning and Phylogeny Analysis of PpAP2 Floral Homologous Genes in Peach. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(7): 99-104
 17. 五倍子: Cloning and characterisation of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Rhus chinensis*. Plant Cell Rep, 2013, published online: 15 March, 2013
 18. :五倍子 1: Cloning, characterization and expression of chalcone synthase from medicinal plant *Rhus chinensis*. J. Plant Biochem. Biotechnol. DOI 10.1007/s13562-013-0231-9
 19. 青杆: cDNA Cloning and Bioinformatic Analysis of the sPPa1 Gene from *Picea wilsonii*. Plant Science Journal, 2012, 30(40): 394-401
 20. 青杆 1: cDNA Cloning and Bioinformatic Analysis of PsbO Gene from *Picea wilsonii*. Life Science Research, 2012, 16(3): 201-206
 21. 青杆 2: Cloning and Tissue Expression Analysis of PwPSAF in *Picea wilsonii*. SCIENTIA SILVAE SINICAE. Vol. 49, No. 10, Oct. 2013.
 22. 洋葱: Molecular Cloning and Transcriptional Analysis of the Putative AGAMOUS Homolog AcAG in Onion (*Allium cepa*). Plant Mol Biol Rep, DOI 10.1007/s11105-013-0607-y
 23. 木瓜: XsFAD2 gene encodes the enzyme responsible for the high linoleic acid content in oil accumulated in *Xanthoceras sorbifolia* seeds. JOURNAL ARTICLE. 2013-6-17.
 24. 木瓜 1: Two novel diacylglycerol acyltransferase genes from *Xanthoceras 2 sorbifolia* are responsible for its seed oil content. GENE-38688; No. of pages: 9; 4C:
 25. 柑橘: Efficient auto-excision of a selectable marker gene from transgenic citrus by combining the Cre/loxP system and ipt selection. Plant Cell Rep, DOI 10.1007/s00299-013-1470-x
 26. 柑橘 1: Expression Analysis of Three Phloem-specific Promoters in Transgenic *Poncirus trifoliata*. Acta Horticulturae Sinica. 2014, 41(1): 1-8.

27. 柑橘 2: Activation of three pathogen-inducible promoters in transgenic citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) after *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* infection and wounding. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. DOI 10.1007/s11240-013-0423-y.
28. 茶梅花瓣: Comparison and Analysis of Methods of Extracting Total RNA from Petals of *Camellia sasanqua*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*. 2013, 29(28):129-133.
29. 栀子: Isolation of High Quality Total RNA from *Gardenia jasminoides* Eills. *Chinese Agricultural Science Bulletin*. 2012, 28(27):194-198
30. 丹参: Genome-wide analysis and molecular dissection of the SPL gene family in *Salvia miltiorrhiza*. 2014 Jan; 56(1):38-50. doi: 10.1111/jjpb.12111. Epub 2013 Nov 20.
31. 牡丹: Transcriptome Comparison Reveals Key Candidate Genes Responsible for the Unusual Reblooming Trait in Tree Peonies. Genes Responsible for Reblooming in Tree Peonies. November 2013 | Volume 8 | Issue 11 | e79996
32. 东南景天: Role of sulfur assimilation pathway in cadmium hyperaccumulation by *Sedum alfredii* Hance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 100, February 2014, Pages 159–165.
33. 山苍子: Identification of appropriate reference genes for normalizing transcript expression by quantitative real-time PCR in *Litsea cubeba*. TECHNICAL NOTE. *Mol Genet Genomics* (2013) 288:727–737, DOI 10.1007/s00438-013-0785-1
34. 木本植物: Heterologous gene silencing induced by tobacco rattle virus (TRV) is efficient for pursuing functional genomics studies in woody plants. ORIGINAL PAPER. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, DOI 10.1007/s11240-013-0393-0
35. 棉花: Analysis of sea-island cotton and upland cotton in response to *Verticillium dahliae* infection by RNA sequencing. Sun et al. *BMC Genomics* 2013, 14:852 /1471-2164/14/852.
36. 桃子: Biochemical changes and defence responses during the development of peach gummosis caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Eur J Plant Pathol* (2014) 138:195–207, DOI 10.1007/s10658-013-0322-4.
37. 桃子 1: Carbohydrate metabolism changes in *Prunus persica* gummosis infected with *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytopathology* "First Look" paper • <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0025-R> • posted 11/27/2013.
38. 海棠: The *Malus* crabapple transcription factor McMYB10 regulates anthocyanin biosynthesis during petal coloration. *Scientia Horticulturae* 166 (2014) 42–49.
39. 海藻: A rapid and sensitive method for field detection of *Prorocentrum donghaiense* using reverse transcription-coupled loop-mediated isothermal amplification. *Harmful Algae* 29 (2013) 31–39.
40. 油茶: Establish a cDNA-AFLP Technology System in *Camellia oleifera*. *Molecular Plant Breeding*, 2013, Vol.11, No.5, 611-616.
41. 亚洲百合: Transcriptomic analysis of Asiatic lily in the process of vernalization via RNA-seq. *Mol Biol Rep*. DOI 10.1007/s11033-014-3250-2.
42. 毛泡桐: Dynamic expression of novel and conserved microRNAs and their targets in diploid and tetraploid of *Paulownia tomentosa*. *Biochimie xxx* (2014) 1e10.
43. 人参: Cloning and Sequence Analysis Squalene Epoxidase Gene in *Panax gin-seng*. *Journal of Jilin Agricultural University* 2014, 36(2): 149-152,17

44. 雪莲: Cloning and Sequence Analysis of rbcS Gene from *Sasussured involucrdta* Kar. et Kir. Chinese Agricultural Science Bulletin 2014, 30(15): 261-267
45. 柑橘 3: Secreted Expression of Cecropin B Gene Enhances Resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Transgenic Citrus *sinensis* 'Tarocco' Acta Horticulturae Sinica 2014, 41(3): 417-428 <http://www.ahs.ac.cn>
46. 菊花: Stem apex detoxification culture markedly improved several physiological characters of chrysanthemum 'YUTAI'. Plant Cell Tiss Organ Cult 2014, DOI 10.1007/s11240-014-0541-1
47. 荞麦和拟南芥: Ectopic expression of *FaesAP3*, a *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) AP3 orthologous gene rescues stamen development in an *Arabidopsis ap3* mutant. Gene 2014, 550(2): 200-206
48. 油松: Differential expression of SLOW WALKER2 homologue in ovules of female sterile mutant and fertile clone of *Pinus tabulaeformis*. Russian Journal of Developmental Biology 2014, 45(2): 78-84
49. 玫瑰花: Precise spatio-temporal modulation of ACC synthase by MPK6 cascade mediates the response of rose flowers to rehydration. The Plant Journal 2014, 79(6): 941-950
50. 棉花和拟南芥: Functional characterization of GhAKT1, a novel Shaker-like K⁺ channel gene involved in K⁺ uptake from cotton (*Gossypium hirsutum*). Gene 2014, 545(1): 61-71
51. 棉花和拟南芥 1: Upland Cotton Gene GhPPF1 Confers Promotion of Flowering Time and Shade-Avoidance Responses in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE 2014, 9(3): e91869. doi:10.1371/journal.pone.0091869
52. 白杨: Poplar GATA transcription factor PdGNC is capable of regulating chloroplast ultrastructure, photosynthesis, and vegetative growth in *Arabidopsis* under varying nitrogen levels. Plant Cell Tiss Organ Cult 2014, DOI 10.1007/s11240-014-0536-y
53. 毛果杨: Molecular characterization of the SPL gene family in *Populus trichocarpa*. BMC Plant Biology 2014, 14: 131
54. 葛根: Molecular cloning and characterization of an isoflavone 7-O-glucosyltransferase from *Pueraria lobata*. Plant Cell Reports 2014, 33(7), 1173-1185
55. 百合: Cloning and Expression Analysis of Actin Gene (*lilyActin*) from Lily. Acta Horticulturae Sinica 2013, 40(7): 1318-1326
56. 百合 1: Vernalization of Oriental hybrid lily 'Sorbonne': changes in physiology metabolic activity and molecular mechanism. Molecular Biology Reports 2014, DOI 10.1007/s11033-014-3545-3
57. 黄鹌菜: Transcriptome Sequencing and De Novo Analysis of *Youngia japonica* Using the Illumina Platform. PLoS ONE 2014, 9(3): e90636. doi:10.1371/journal.pone.0090636
58. 棉花 1: Gibberellin Overproduction Promotes Sucrose Synthase Expression and Secondary Cell Wall Deposition in Cotton Fibers. PLoS ONE 2014, 9(5): e96537. doi:10.1371/journal.pone.0096537
59. 苹果: Low Medium pH Value Enhances Anthocyanin Accumulation in *Malus Crabapple* Leaves. PLoS ONE 2014, 9(6): e97904. doi:10.1371/journal.pone.0097904
60. 毛果杨: Three homologous genes encoding functional D8-sphingolipid desaturase in *Populus tomentosa*. Genes Genom 2014, 36: 293-301