

Code No. 9192

研究用

TAKARA

Fruit-mate™ for RNA Purification

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 试剂盒外必备材料	1
● 保 存	1
● RNA 提取实验前的准备	2
● 实验操作	2
● Troubleshooting	7
● 参考文献	8
● 关联产品	8

● 制品说明

本制品作为使用RNAiso Plus或NucleoSpin RNA Plant进行RNA提取的辅助试剂，可以高效地从植物材料（如块根作物、水果和种子等）中提取高纯度的Total RNA。由于本制品中含有高分子聚合物，能够有效地与组织样品中的多糖多酚结合，并可以在之后的离心步骤中除去。因此，当单纯使用RNA提取试剂盒很难提取植物RNA时，可使用本制品进行高效提取。

与RNAiso Plus结合使用时，将本制品加入样品之中并混合均匀，然后离心除去不溶物。向上清液中加入等体积的RNAiso Plus，再加入氯仿并混合均匀。离心后溶液分为三层，取最上层进行异丙醇沉淀回收total RNA。所有total RNA提取过程在1小时之内完成。

与NucleoSpin RNA Plant结合使用时，将本制品加入样品之中并混合均匀，然后离心除去不溶物。向上清液中加入RA1（或者RAP），充分混合后使用NucleoSpin Filter除去不溶物。向flow-through内加入70%乙醇调制成lysate，利用附有silica membrane的cartridge离心回收total RNA。全部操作只需要30分钟。得到的total RNA可用于RT-PCR、Northern blot分析或mRNA的纯化。

以下植物（部分组织）使用本制品提取RNA，回收效率得到了提高。

<本制品对如下植物（部分组织）RNA的提取有效果>

樱桃番茄（果实），香蕉（果肉），草莓（果实），番茄（种子），水稻（种子），马铃薯（根茎），橘子（果皮），菠萝（叶片），芦荟（叶片），芒果（果实），拟南芥（种子），菊（叶片），蔷薇（叶片）。

【注】本制品适用于多糖多酚含量较高的植物。由于植物种类的不同，使用本制品也可能出现没有改善效果或total RNA回收效率降低的情况，因此，在对上述植物以外的植物进行实验时需要尝试。

● 制品内容

Fruit-mate for RNA purification

100 ml

● 试剂盒外必备材料

与RNAiso Plus组合使用时

- ◆ RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)
- ◆ 氯仿
- ◆ 异丙醇
- ◆ 75%乙醇
- ◆ RNase-free 水或 TE

与NucleoSpin RNA Plant组合使用时

- ◆ NucleoSpin RNA Plant (Code No. 740949.10/.50/.250)
- ◆ 1 M 或者 2 M DTT 溶液
- ◆ 特级乙醇 (>99%)
- ◆ 70%乙醇
- ◆ RNase-free tube

● 保 存

室温保存

- * 自收到之日起，适当条件下保存，两年内有效。开封后请尽快使用，尽量避免污染。
- * 20°C以下保存可能会出现沉淀，使用前请于 37°C溶解沉淀。

● RNA 提取实验前的准备

1. 实验应使用无菌的 RNase-free 的一次性塑料制品，任何非 RNase-free 的塑料用具在使用前都要进行高压灭菌。若使用玻璃器皿，需要 160°C 干热灭菌至少 2 小时。如不能进行干热灭菌，则使用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37°C 下处理 12 小时，然后再灭菌使用。
2. RNA 实验用的器具建议专门使用，不要用于其它实验。
3. 试剂尽可能使用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）处理，灭菌后使用。如果有些试剂不能进行高压灭菌，则使用无菌水和无菌器皿进行溶液配制，使用前过滤除菌。
4. 样品的制备过程中应使用的防御措施：戴一次性干净手套，在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

● 实验操作

关于样品

使用本制品可使多糖多酚含量较高的根茎以及果肉组织（果肉、果皮和种子）的 RNA 提取效果得到提升，植物种类如下所示，未列出的植物使用本制品可能没有改善效果或 RNA 的回收效率较低。

<本制品对如下植物（部分组织）RNA 的提取有效果>

櫻桃番茄（果实），香蕉（果肉），草莓（果实），番茄（种子），水稻（种子），马铃薯（根茎），橘子（果皮），菠萝（叶片），芦荟（叶片），芒果（果实），拟南芥（种子），菊（叶片），蔷薇（叶片）。

如果使用多糖多酚含量较低的芽及嫩叶作为提取材料时，使用本制品可能会降低收率，因此建议单独使用 RNAiso Plus 或 NucleoSpin RNA Plant。

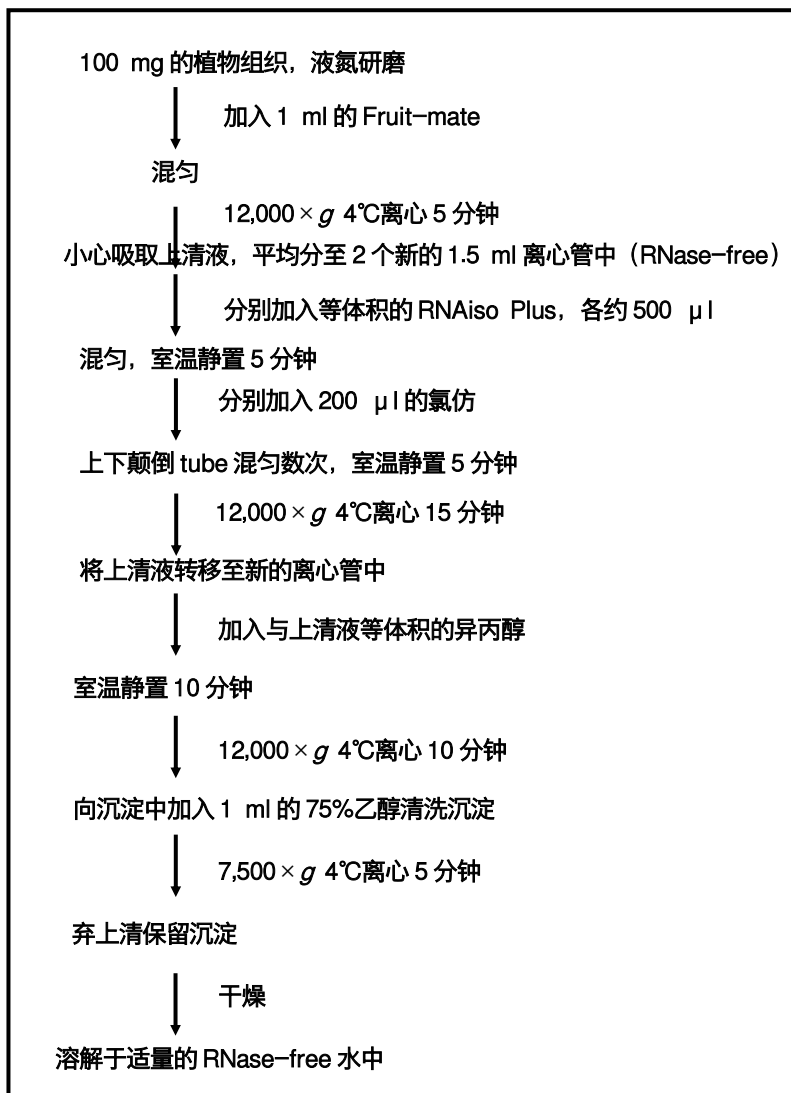
关于 RNA 提取试剂

本制品应与 RNAiso Plus（Code No. 9108/9109）或 NucleoSpin RNA Plant（Code No. 740949.10/.50/.250）组合使用。与其它提取试剂的组合使用未经验证过。

方法 1（使用 RNAiso Plus）

1. 取足量 100 mg 的植物组织于研钵中，迅速转移至用液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状。
2. 取 100 mg 粉末加入到 1.5 ml 液氮预冷的 RNase-free tube 中。加入 1 ml 的本制品，混匀后立即以 $12,000 \times g$ ，4°C 离心 5 分钟。将上清液等体积分装于两个新的 1.5 ml tube 中。
3. 分别向上述步骤 2 的匀浆裂解液中加入 0.5 ml 的 RNAiso Plus（等体积），盖紧离心管盖，用力振荡，待溶液充分乳化后（无分相现象），室温静置 5 分钟。
4. 分别向上述每个 tube 中加入 200 μ l 的氯仿，盖紧离心管盖，反复颠倒 tube 混合，待溶液充分乳化（无分相现象）后，再室温静置 5 分钟。 $12,000 \times g$ 4°C 离心 15 分钟。从离心机中小心取出离心管，此时匀浆液分为三层，即：无色的上清液、中间层的白色蛋白层及带有颜色的下层有机相。
5. 吸取上清液转移至另一新的离心管中（切忌吸出白色中间层）。
6. 向上清液中加入与上清液等体积的异丙醇，上下颠倒离心管充分混匀后，在室温静置 10 分钟。 $12,000 \times g$ 4°C 离心 10 分钟。一般在离心后，RNA 会沉淀在管底。
7. 小心弃去上清，缓慢地沿离心管壁加入 75% 的乙醇 1 ml（切勿触及沉淀），轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁， $7,500 \times g$ 4°C 离心 5 分钟。
8. 小心弃去乙醇收集沉淀。
9. 室温干燥沉淀，加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀。
[注]RNA 较难溶解，因此请不要使用离心或加热的方法干燥 RNA。

流程图 1 (方法 1: 使用 RNAiso Plus)



使用 RNAiso Plus 的实验例 1 的结果

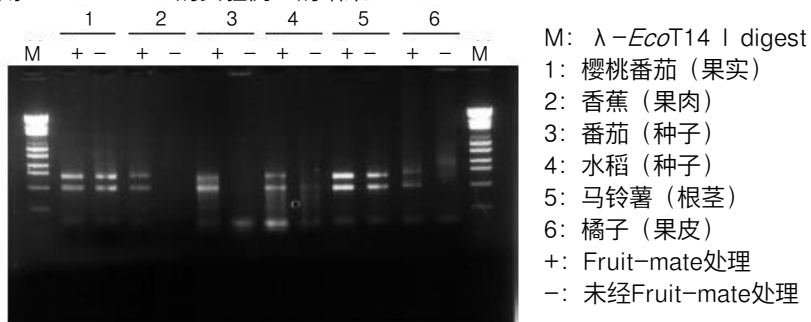
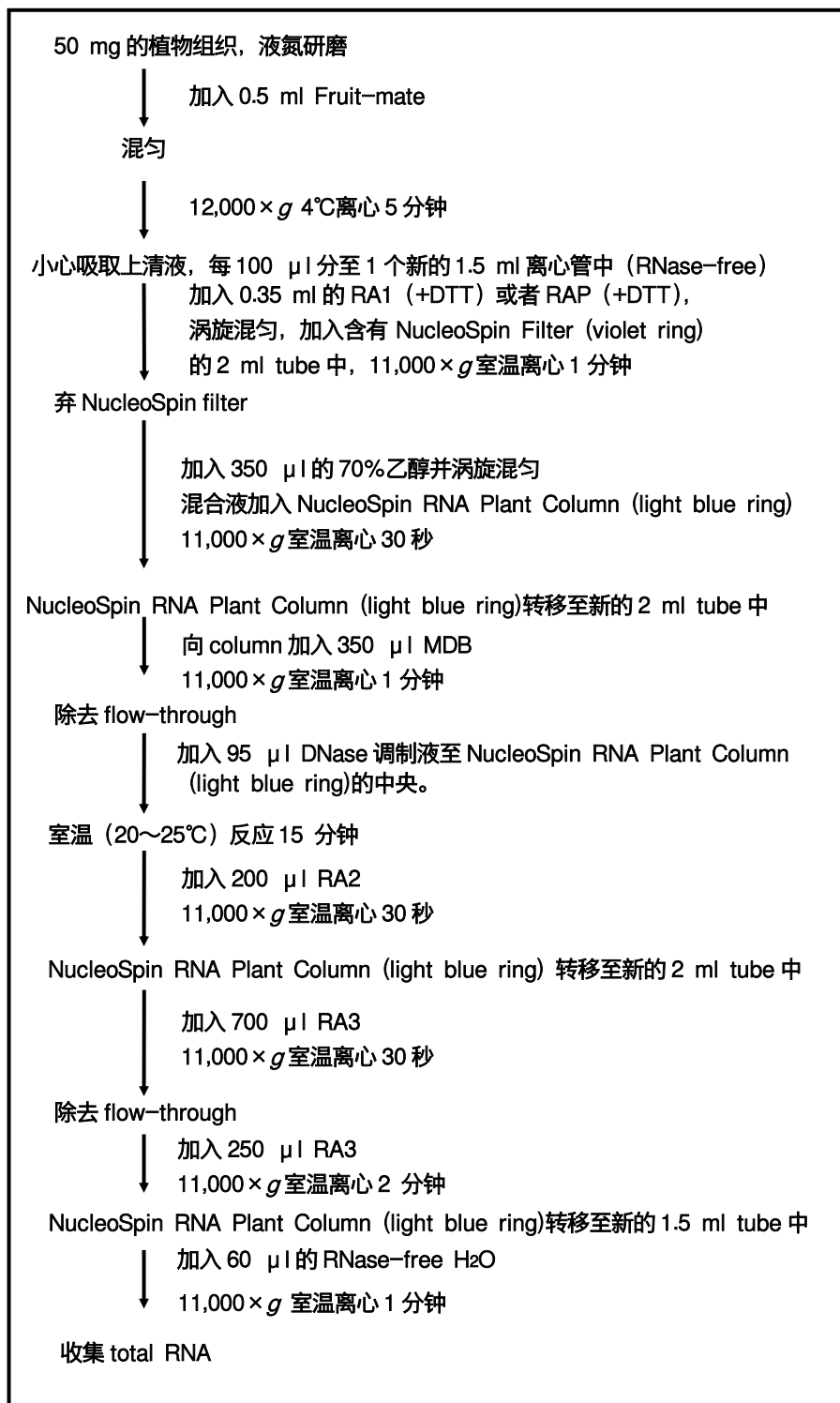


图 1. 在 Fruit-mate 处理后 (+) 和未处理 (-) 情况下, 使用 RNAiso Plus 提取 total RNA 的电泳图片

方法2 (使用 NucleoSpin RNA Plant)

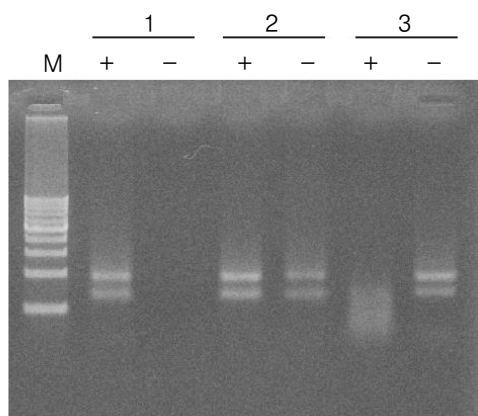
1. 取足量 100 mg 的植物组织于研钵中，迅速转移至用液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状。
2. 取 50 mg 粉末加入到 1.5 ml 液氮预冷的 RNase-free tube 中。加入 0.5 ml 的本制品，混匀。
3. 以 $12,000 \times g$ ， 4°C 离心 5 分钟。将上清液每 100 μl 体积分装于新的 1.5 ml tube 中。
4. 分别向上述步骤 3 的 100 μl 上清液中加入 0.35 ml 的 RA1 (+DTT) 或者 RAP (+DTT)，涡旋混匀。
5. 上述步骤 4 的溶液加入到含有 NucleoSpin Filter (violet ring) 的 2 ml tube 中， $11,000 \times g$ 室温离心 1 分钟。
6. 废弃 NucleoSpin filter。向 flow-through 内加入 350 μl 70%乙醇，充分混匀。混合液加入 NucleoSpin RNA Plant Column (light blue ring)， $11,000 \times g$ 室温离心 30 秒。
7. NucleoSpin RNA Plant Column (light blue ring) 转移至 2 ml tube 中。向 Column 中加入 350 μl MDB (Membrane Desalting Buffer)， $11,000 \times g$ 室温离心 1 分钟。除去 flow-through。
8. 加入 95 μl DNase 调制液至 NucleoSpin RNA Plant Column (light blue ring) 的中央。室温 ($20\sim 25^{\circ}\text{C}$) 反应 15 分钟。
9. 加入 200 μl RA2， $11,000 \times g$ 室温离心 30 秒。
10. NucleoSpin RNA Plant Column (light blue ring) 转移至新的 2 ml tube 中。加入 700 μl RA3*， $11,000 \times g$ 室温离心 30 秒。
*建议添加 700 μl RA3。NucleoSpin RNA Plant Column 说明书中添加量是 600 μl 。
11. 除去 flow-through。加入 250 μl RA3， $11,000 \times g$ 室温离心 2 分钟。
12. NucleoSpin RNA Plant Column (light blue ring) 转移至新 1.5 ml tube 中。加入 60 μl RNase-free H_2O ， $11,000 \times g$ 室温离心 1 分钟。
13. RNA 回收完成，如不立即使用，应于 -20°C 或 -80°C 保存。

流程图 2 (方法 2: 使用 NucleoSpin RNA Plant)



使用 NucleoSpin RNA Plant 的实验例 2 的结果

从以下植物组织中，按照方法 2 使用 RA1 进行 total RNA 提取。并进行 Fruit-mate 处理有无进行提取效果比较。Total RNA 提取的各植物组织起始量相同。



M: 1 kb Ladder

1: 香蕉 (果肉)

2: 樱桃番茄 (果实)

3: 山毛榉丛生口蘑 (伞+柄) *

+: Fruit-mate处理→RA1添加

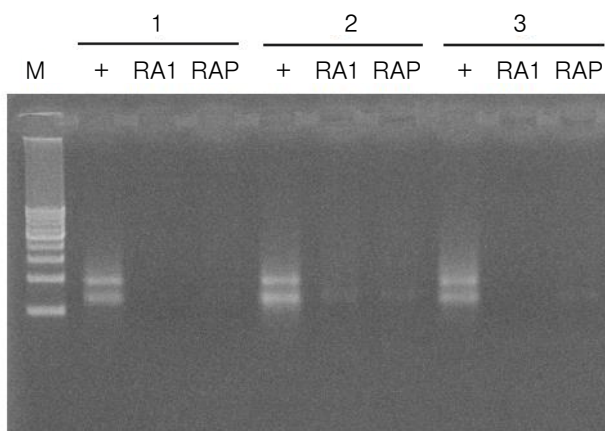
-: 未经Fruit-mate处理→RA1添加

*山毛榉丛生口蘑 (伞+柄) 使用Fruit-mate 处理的效果不好。

图 2. 在 Fruit-mate 处理后 (+) 和未处理 (-) 情况下，使用 NucleoSpin RNA Plant 提取 total RNA 的电泳图片

使用 NucleoSpin RNA Plant 的实验例 3 的结果

从以下植物组织中，按照方法 2 使用 RA1 或者 RAP 进行 total RNA 提取。并进行 Fruit-mate 处理有无进行提取效果比较。Total RNA 提取的各植物组织起始量相同。



M: 1 kb Ladder

1: 马铃薯 (根茎)

2: 菊 (叶片)

3: 蔷薇 (叶片)

+: Fruit-mate处理→RA1添加

RA1: 未经Fruit-mate处理→RA1添加

RAP: 未经 Fruit-mate 处理→RAP 添加

图 3. 在 Fruit-mate 处理后 (+) 和未处理 (-) 情况下，使用 RA1 或者 RAP 提取 total RNA 的电泳图片

● Troubleshooting

1. 提取的 RNA 量较低

◆ 样品匀浆不完全

研磨样品直至成为粉末状。

◆ 组织中 RNA 量较低

在一些植物组织中 RNA 含量较低, 据报道, 植物的根部比其他组织中的 RNA 含量低, 成熟叶片比嫩叶中含量低, 一般情况下植物组织中所能提取的 RNA 量如下表:

组织材料	起始样品量	Total RNA提取量 (RNAiso Plus)	Total RNA提取量 (NucleoSpin RNA Plant)
樱桃番茄果实	50 mg	10-15 μ g	3-4 μ g
香蕉果肉	50 mg	10-15 μ g	3-4 μ g
番茄种子	50 mg	10-20 μ g	-
水稻	50 mg	5-10 μ g	-
马铃薯	50 mg	5-10 μ g	10-15 μ g
橘子果皮	50 mg	5 μ g	-
菊	50 mg	-	50 μ g
蔷薇	50 mg	-	50 μ g

-: 没有检测。

◆ 样品中多糖或多酚的含量较低

本制品是适用于提取多糖和多酚含量较高的植物组织 RNA 的辅助试剂。参考“实验操作”的“关于样品”部分提到的本制品在相关植物中的效果。如果单独使用 RNAiso Plus 或 NucleoSpin RNA Plant 能高效提取 RNA, 则添加本制品会降低回收效率。

◆ 其他

参见 RNAiso Plus 和 NucleoSpin RNA Plant 说明书中的 troubleshooting。

2. 提取的 RNA 纯度较低

◆ Fruit-mate 和 RNAiso Plus 或 NucleoSpin RNA Plant 中的 Lysis Buffer 添加量低于组织样品的量, 可能导致蛋白变性不充分。

◆ 在 RNA 提取过程中使用 75%乙醇洗涤之后干燥过度, RNA 没有完全溶解。因此不要加热干燥或过度干燥 RNA。如果干燥过度, 可在 60°C加热 5 分钟, 然后冰上放置数小时, RNA 可能会溶解。

◆ 参见 RNAiso Plus 和 NucleoSpin RNA Plant 说明书中的 troubleshooting。

3. 提取的 RNA 降解

◆ 使用的组织材料不够新鲜。提取 RNA 的组织材料应采用新鲜的组织材料, 或将新鲜的组织材料用液氮迅速冷冻后置于-80°C保存。

◆ 提取 RNA 时使用的试剂及器材中混有 RNA 分解酶。

◆ 参见 RNAiso Plus 和 NucleoSpin RNA Plant 说明书中的 troubleshooting。

4. 提取的 RNA 中含有 DNA 污染

◆ 裂解组织或细胞使用的 RNAiso Plus 量偏少, 应按建议体积量添加。

◆ 使用的组织材料中含有大量的有机溶剂(如: 乙醇、异丙醇等)、高浓度的 Buffer、碱性溶剂等。

◆ 如果提取的 RNA 中含有 DNA 时, 建议使用 Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A/B)进行 DNA 消化。

◆ 参见 RNAiso Plus 和 NucleoSpin RNA Plant 说明书中的 troubleshooting。

● 参考文献

- 1) J Chirgwin, *et al.* "Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease". *Biochemistry*. (1979) **18** (24): 5294–5299.
- 2) D Wallace. "Large–and Small–Scale Phenol Extractions". *Methods in Enzymology*. (1987) **152**: 33–41.
- 3) Coombs L M, Pigott D, Proctor A, Eydmann M, Denner J, and Knowles M A. "Simultaneous Isolation of DNA, RNA, and Antigenic Protein Exhibiting Kinase Activity from Small Tumor Samples Using Guanidine Isothiocyanate". *Anal Biochem*. (1990) **188**: 338–343.
- 4) Nicolaides N C and Stoeckert Jr C J. "A Simple, Efficient Method for the Separate Isolation of RNA and DNA from the Same Cells". *Biotechniques*. (1990) **8**: 154–156.
- 5) J R Feramisco, *et al.* *Molecular Cloning*: 194–195. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- 6) Raha S, Merante F, Proteau G, and Reed J K. "Simultaneous Isolation of Total Cellular RNA and DNA from Tissue Culture Cells Using Phenol and Lithium Chloride". *Gene Anal Techn*. (1990) **7**: 173–177.

● 关联产品

NucleoSpin RNA Plant (Code No. 740949.10/.50/.250)
RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)
Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A/B)

Fruit-mate is a trademark of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v201909Da