



# Dendrobium officinale Kimura & Migo RNADNA Kit (铁皮石斛RNA/DNA共提取试剂盒)

CAT. NO. ZJ0069      规格: 50T

## 产品说明:

本产品利用磁珠在特定缓冲液条件下可与核酸结合原理, 在磁场作用下富集核酸; 裂解液中含有高浓度的多糖多酚去除剂, 适宜从石斛中提纯DNA与RNA。

**产品组成:** 请使用前在对应组分的瓶盖及标签上用马克笔标注序号(①②③...), 方便后续使用。

产品组分	ZJ0069
① ZJ DNA/RNA Extraction Lysis Buffer	50mL <sup>#</sup>
② 多糖多酚去除剂	20ml
③ PS	10mL
④ BGMG For RNA	50mg <sup>*</sup>
⑤ RNA WB1	12mL <sup>**</sup>
⑥ RNA WB2	16.5mL <sup>***</sup>
⑦ DEPC-Treated ddH2O	3mL

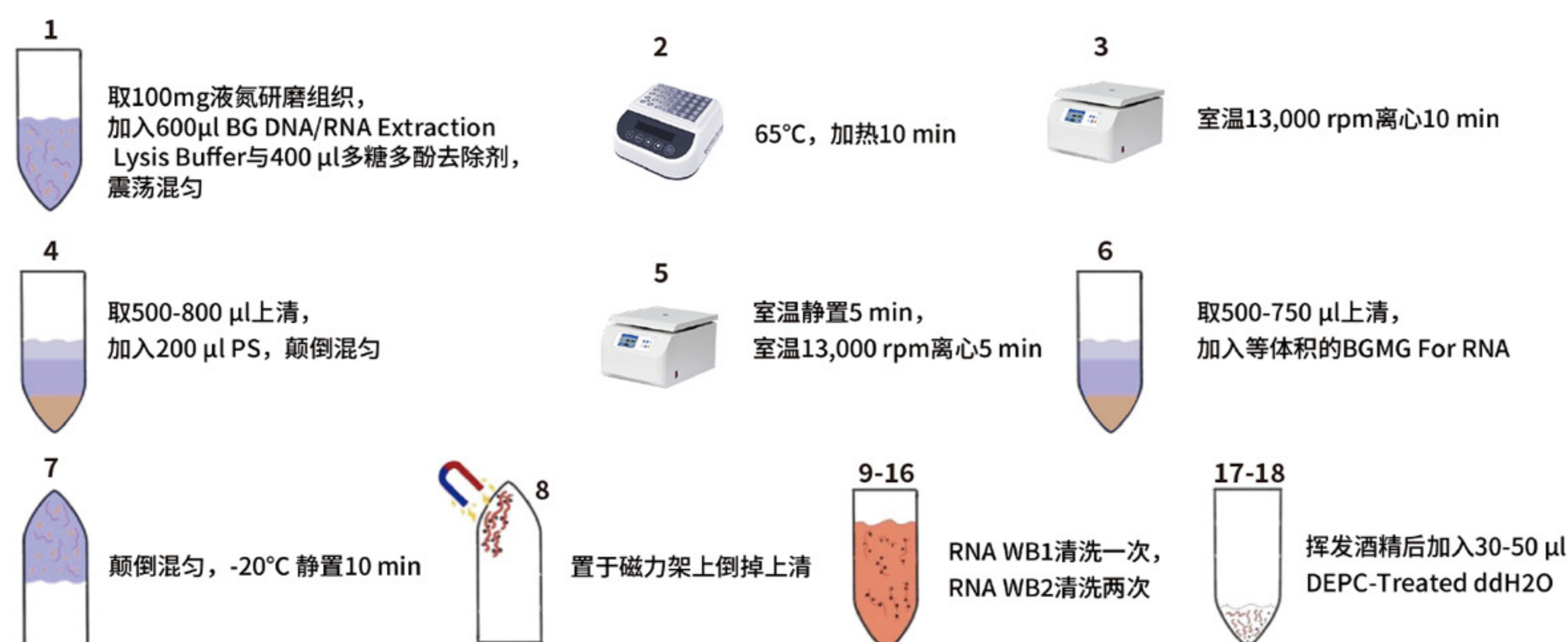
## 特别注意:

<sup>#</sup> ZJ DNA/RNA Extraction Lysis Buffer在温度较低的情况下会有盐离子析出, 若溶液变浑浊, 需预先在65°C水浴锅中加热融化;

<sup>\*</sup>使用前需加入50 mL无水乙醇; <sup>\*\*</sup>使用前需加入21mL无水乙醇; <sup>\*\*\*</sup>使用前需加入38.5mL无水乙醇。

## 注意事项:

本实验中所使用的所有塑料制品或玻璃制品需要经过DEPC处理或者直接购买商品化RNase-Free产品; 本实验中所用的无水乙醇应该使用专门用于RNA提取的无水乙醇或使用第一次开封的无水乙醇(若仅需要DNA, 可使用普通耗材); 冻存样品应该避免反复冻融; 倒去上清时注意将离心管放置在磁力架或替代磁场中, 以免磁珠损失。



#### 使用说明:

注:① ZJ DNA/RNA Extraction Lysis Buffer、④BGMG For RNA 、⑤RNA WB1、⑥RNA WB2、⑦ DEPC-Treated ddH<sub>2</sub>O需提前预冷至4°C;

1、取约100mg液氮充分研磨的石斛样本于离心管中,加入600 μl ① ZJ DNA/RNA Extraction Lysis Buffer与400 μl②多糖多酚去除剂,迅速震荡混匀;

2、65°C, 10min (期间上下颠倒2至3次);

3、室温13,000 rpm离心10 min (如果样品中富含色素,会在上清中形成一团不能沉淀的絮状物质,色素在后期清洗中会除去,并不影响后续实验);

4、将约500-800 μl的上清转移到新的离心管中,注意不要吸到沉淀,加入200 μl ③PS;

5、颠倒混匀后,室温静置5 min,然后13,000 rpm,室温离心5min;

6、小心吸取500 μl至750 μl上清 (注意不要吸到中间层),加入等体积的提前预冷的④BGMG For RNA,颠倒混匀后-20°C静置10 min;

7、将装有混合物的离心管置于磁力架或其他形式的磁场中,静置10s,直至磁珠被完全富集 (静置时间与磁场强度相关,可以根据观察溶液澄清程度确定静置时间);

注意:离心管盖上有时会残留磁珠,可通过颠倒磁力架,使磁珠富集到一起。

8、在磁场中倒去上清;

9、加入500 μl提前预冷的⑤RNA WB1(确认使用前已加入无水乙醇),脱离磁场,剧烈震荡或者涡旋10s (剧烈分散纳米磁珠,否则将影响纯度);

10、将离心管再次放入磁力架或其他形式的磁场中,静置10s (静置时间与所处磁场强度相关);

11、将上清倒去,加入500 μl提前预冷的⑥RNA WB2(确认使用前已加入无水乙醇),脱离磁场,剧烈震荡或者涡旋10s (剧烈分散纳米磁珠,否则将影响纯度);

12、将离心管再次放入磁力架或其他形式的磁场中,静置10s (静置时间与所处磁场强度相关);

13、在磁场中倒去上清;

14、再次加入⑥500 μl RNA WB2,脱离磁场,剧烈震荡或者涡旋10s (剧烈分散纳米磁珠,否则将影响纯度);

15、将离心管再次放入磁力架或其他形式的磁场中,静置10s (静置时间与所处磁场强度相关);

16、在磁场中倒去上清;

17、清除残留乙醇\*;

\*清除残留乙醇方案:

a) 用枪头吸掉底部和盖子上残留的液体,并打开盖让乙醇挥发10-15min,等待期间会有液体再次聚集在管底,需要再次吸弃;

b) 瞬时离心后将离心管放回磁力架中,吸弃管底残余液体,挥发酒精的时间与环境风速、温度、残余酒精量等参数相关,需要根据实际情况进行细微调节;

\*清除残留乙醇的程度至关重要:乙醇清除程度不够,会影响最终RNA/DNA浓度(浓度过低)。乙醇清除程度过大(时间过久),会导致RNA/DNA被磁珠牢牢吸附,DEPC-Treated ddH<sub>2</sub>O无法从磁珠上洗脱RNA/DNA;判断清除残留乙醇到合理程度有3种方法:

a) 把离心管放入磁力架中,乙醇清除时间在10-15分钟;

b) 把离心管放入磁力架中,通过观察磁珠表面的反光程度,当发现反光程度降低到原有的一半左右,即可;

c) 把离心管放入磁力架中,通过观察磁珠表面的龟裂情况,当发现磁珠表面刚出现龟裂时,即可。

18、加入30  $\mu$ l -50 $\mu$ l ⑦DEPC-Treated ddH<sub>2</sub>O, 涡旋混匀或者用指头弹拨管底使得磁珠完全重悬, 静置10 S, 等待核酸充分脱离磁珠;

19、将离心管再次置于磁力架上, 澄清的溶液即为RNA溶液(可带磁珠保存);

注: 如果磁珠未充分分散, 磁珠之间包含有杂质, 在最后一步加入DEPC水后, 磁珠会严重挂壁且明显结块(轻微挂壁、黏附在管壁是正常现象, 可放入磁力架中取出RNA溶液, 也可以带磁珠保存)。

#### 重要说明:

关于如何提高RNA/DNA的纯度与浓度

#### 提高纯度的方法:

a) 吸取上清液时, 若吸到蛋白质层, 则会导致260/280比值偏低。此外, 如果由于磁珠清洗不到位, 导致 ZJ DNA/RNA Extraction Lysis Buffer残留, 也会使260/280比值偏低。如果260/280比值异常, 浓度检测会偏离真实值(虚高)。通过琼脂糖凝胶电泳来判断污染类型。如果在点样的孔道附近亮, 则为蛋白污染, 且污染越严重, 孔道附近越亮;

b) 纳米磁珠表面富有活性基团, 在高浓的乙醇环境中, 牢牢的吸附核酸。虽然磁珠不会特异吸附杂质, 但会轻微附着在表面, 且磁珠比重高, 容易沉淀, 如果有杂质包裹在磁珠之间未得到有效清洗, 则会导致260/280, 260/230异常。**有效清洗: 适当增加涡旋时间, 如涡旋20S**, 以分散每一颗磁珠。一共有四次需要分散磁珠(吸上清后、WB1一次、WB2两次);

c) 如果不使用PS, 260/280在1.8左右, 使用PS后260/280可达到2.0-2.2(两种对于反转录定量均可)。如果清洗过程中磁珠未充分分散, 磁珠之间包含有杂质, 在最后一步加入DEPC水后, 磁珠会严重挂壁且明显结块, 此种情况RNA纯度会很低, 需重做实验(轻微挂壁、黏附在管壁是正常现象, 可放入磁力架中取出RNA溶液, 也可以带磁珠保存);

d) 上清液溶解有RNA/DNA, 在保证不吸取得到沉淀的情况下, 尽量多吸取上清, 如果有吸取得到轻微沉淀后续清洗也能去除, 如果有吸取得到大量沉淀, 建议用WB2清洗三次;

#### 提高浓度的方法:

a) 适当增加样本量, 具体的量可能根据不同样品进行调整(增大加样量至2倍);

b) 增加细胞吹打强度, 提高细胞破碎的比例;

c) 对于粘性较大的样本, 65 $^{\circ}$ C处理10min可提高核酸提取效率;

d) 可减少最终DEPC水体积。