# Planteasy法标准化操作流程

**1 实验目的**

提取样品RNA

**2适用范围**

本标准操作规程适用于富含多糖多酚且多糖多酚含量异常高的样本RNA提取，非此类样品RNA的提取流程与本标准操作规程不同，须按照其它样品RNA提取操作规程进行。

**成功提取样本组织：海棠果实和叶片样本**

**3 实验原理**

总RNA提取的原理就是通过裂解液将细胞裂解，释放出RNA，并通过多次抽提去除蛋白、多糖多酚等杂质，最终获得高纯度的RNA的过程。

**4 实验仪器**

高速离心机、水浴锅

5 试剂耗材

Planteasy配方：

配制规模：100ml

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂名称 | 终浓度 | 用量 |
| β-巯基乙醇 | 20% | 20ml |
| 0.5M EDTA | 100mM | 20ml |
| Tween 20 | 1% | 1ml |
| 10% SDS | 0.02% | 200ul |

加DEPC水到100ml。

**注意**：Tween20溶液很粘稠，最后加入，使用剪了尖的枪头吸取，且要慢慢吸取，否则容易体积不准。吸入到溶液中后吹打几次枪头，尽量放完。然后需要盖紧盖子使劲混匀，因为Tween20不容易溶解。

巯基乙醇用量较大，且气味较大，一定在通风橱中加入，加入后枪头即刻丢弃到大的垃圾桶中，以免气味太大影响其他人正常工作。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 裂解液 | 1ml |
| 5M NaCl | 2400ul |
| 氯仿 | 1.5ml |
| 异丙醇 | 700ul |
| 75%乙醇 | 2ml |

6 操作步骤

1. 取不多于 100mg冷冻的研磨过的植物组织，加入1ml 提取试剂中，振荡至彻底混匀。
2. 室温放置 5 分钟。注意：平放离心管，使表面积最大。
3. 室温 12,000 rpm 离心3分钟，上清转入新的2 ml 无RNase 离心管。
4. 加 1/5体积 5M NaCl，温和混匀。再加 1/2总体积氯仿，上下颠倒混匀。
5. 4℃ 12,000 rpm 离心 10 min，取上层水相转入新的无 RNase 离心管。
6. 加入等体积氯仿再抽提一遍，取上层水相转入新的无 RNase 离心管。
7. 加与所得水相等体积的异丙醇，混匀，室温放置10 min。
8. 4℃ 10,000 rpm离心15 min。弃掉上清，注意不要倒出沉淀。加 1ml 75％乙醇。
9. 4℃ 5,000 rpm 离心 5 min。小心倒出液体，注意不要倒出沉淀。用1ml 75％乙醇重复洗剂一次，剩余的少量液体可再次离心收集，然后用枪头吸出弃掉。
10. 超净工作台吹干或者室温晾干3-5min（RNA样品不要过于干燥，否则很难溶解）
11. 根据沉淀大小加无RNase水，涡旋振荡器上混匀充分溶解RNA。如有絮状物，可室温12,000 rpm离心1min，取上清转入干净的无RNase离心管中，-70度保存

**7 注意事项**

（1）Planteasy试剂4度保存