

版本号: DP170825

Magnetic Tissue/Cell/Blood Total RNA Kit

磁珠法组织/细胞/血液总RNA提取试剂盒

目录号: DP761

产品内容

产品组成	DP761 (50 preps)
裂解液RL(Buffer RL)	30 ml
去蛋白液RD(Buffer RD)	48 ml
漂洗液RW(Buffer RW)	2 × 12 ml
RNase-Free ddH ₂ O	15 ml
磁珠悬浮液W (MagAttract Suspension W)	2 × 1 ml

选配试剂及工具

DNase I (目录号: RT411); 拼插式磁力架 (目录号: MF-01); 10 × 红细胞裂解液H (目录号: RT122); RNase-Free过滤柱CS (目录号: RK176)

储存条件

本试剂盒置于室温(15-25°C)干燥条件下, 可保存12个月, 更长时间的保存可置于2-8°C。该试剂盒中磁珠悬浮液W初次使用后建议置于2-8°C保存12个月。加入β-巯基乙醇的裂解液RL 4°C可放置1个月。

产品简介

本试剂盒采用具有独特分离作用的磁珠和独特的缓冲液系统，从各种组织、细胞、血液中分离纯化高质量总RNA。独特包埋的磁珠，在一定条件下对核酸具有很强的亲和力，而当条件改变时，磁珠释放吸附的核酸，能够达到快速分离纯化核酸的目的。

本产品可与Kingfisher Flex96、TGuide S32自动核酸提取仪完美契合，通过特制的磁棒吸附、转移和释放磁珠，从而实现磁珠和核酸的转移，提高了自动化程度。整个实验过程安全、便捷，提取的总RNA纯度高，没有基因组、蛋白和其它杂质的污染。如果需要高通量自动化提取，天根公司可以提供整合方案。

使用本试剂盒纯化的RNA适用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

产品特点

1. 本试剂盒即可满足手工提取也可适用于多种高通量平台批量提取。
2. 本试剂盒所得产物满足下游各类检测实验以及NGS分析。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 操作前在裂解液RL中加入 β -巯基乙醇至终浓度1%，如1 ml 裂解液RL中加入10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配，配好的裂解液RL 4 $^{\circ}$ C可放置1个月，裂解液RL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
2. 第一次使用前应在去蛋白液RD与漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。

用户自备试剂和仪器

β -巯基乙醇、异丙醇、无水乙醇、匀浆设备(研钵、电动匀浆器等)、磁力架

一、组织/细胞总RNA提取

1. 样本处理

1) 组织样本匀浆:

注意: 组织量不要超过20 mg, 否则可能导致RNA得率和质量下降。对于富含DNA的样本, 如脾脏, 建议使用5 mg。

取新鲜或-80℃冻存的组织, 液氮充分研磨成粉末状, 称取5-20 mg至装有450 μ l裂解液RL(使用前检查是否加入 β -巯基乙醇)的1.5 ml离心管(或者取适量组织加入裂解液后, 电动匀浆), 立即涡旋混匀, 室温静置5 min, 12000 rpm 离心5 min, 小心吸取上清。

2) 细胞样本处理:

a. 悬浮细胞的收集(收集细胞数量请不要超过 1×10^7): 估计细胞数量, 300 \times g离心5 min, 将细胞收集到离心管中, 仔细吸除所有培养基上清。

b. 胰蛋白酶处理法: 确定细胞数量, 吸除培养基, 用PBS溶液洗涤细胞, 吸除PBS溶液, 向细胞中加入含有0.10-0.25%胰蛋白酶的PBS溶液处理细胞, 当细胞脱离容器壁时, 加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶, 将细胞溶液转移至RNase-Free的离心管中, 300 \times g离心5 min, 收集细胞沉淀, 仔细吸除所有上清。

注意: 收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净, 否则会导致裂解不完全, 影响RNA与磁珠的结合, 造成RNA的产量降低。

裂解细胞

沉淀细胞数量	裂解液RL (μ l)
$<5 \times 10^6$	450
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

-
2. 取上述样本匀浆液450 μl ，加入400 μl 异丙醇和40 μl 磁珠悬浮液W，振荡器混匀5 min，使磁珠吸附RNA。
 3. 将离心管置于磁力架上静置3 min，磁珠完全吸附后，小心吸出液体弃去。
 4. 将离心管从磁力架上取下，加入900 μl 去蛋白液 RD (使用前检查是否加入无水乙醇)，振荡混匀2 min。
 5. 将离心管置于磁力架上静置3 min，磁珠完全吸附后，小心吸出液体弃去，室温晾干5min。
 6. (可选)将离心管从磁力架上取下，进行DNase I 消化：
5 μl DNase I，70 μl RDD 缓冲液。将配好的工作液加入样本管中，室温放置15 min，期间每5min颠倒混匀一次。
 7. 加入700 μl 去蛋白液 RD (使用前检查是否加入无水乙醇)，振荡器混5 min。
 8. 将离心管置于磁力架上静置3 min，磁珠完全吸附后，小心吸出液体弃去。
 9. 将离心管从磁力架上取下，加入700 μl 漂洗液RW (使用前检查是否加入无水乙醇)，振荡器混匀2 min。
 10. 将离心管置于磁力架上静置3 min，磁珠完全吸附后，小心吸出液体弃去。
 11. 重复步骤9和10一次。
 12. 短暂离心将残余溶液收集至管底，将离心管置于磁力架上，吸出所有液体弃去，室温晾干5 min。
 13. 将离心管从磁力架上取下，加入50-100 μl RNase-Free ddH₂O，60 $^{\circ}\text{C}$ 加热洗脱5 min，期间颠倒混匀4-5次以充分洗脱RNA (或置于可加热的振荡器上洗脱)。
 14. 将离心管放置于磁力架上静置3 min，磁珠完全吸附后，小心将RNA溶液转移至干净的离心管，继续后续实验或保存于-70 $^{\circ}\text{C}$ ~-80 $^{\circ}\text{C}$ 。

二、血液总RNA提取

注：本试剂盒仅适用于提取新鲜血液总RNA，不适用于冻存血。

1. 红细胞裂解液的稀释：根据处理血液样品的体积选取适当体积的10×红细胞裂解液H（例如待处理的血液样品体积为200 μl，则取140 μl 10×红细胞裂解液H），用RNase-Free ddH₂O稀释至1×红细胞裂解液H。

2. 向1倍体积新鲜全血中加5倍体积1×红细胞裂解液H（需自备合适的干净管子）。

注意：

a. 为获得最佳的混匀效果，血液和1×红细胞裂解液H的混合液体积不应超过管子体积的3/4。如果血液中的白细胞含量较高，可按比例减小血液的使用体积，第7步中的裂解液RL的使用体积也要进行相应调整。

b. 此处新鲜全血仅指哺乳动物；禽类血由于红细胞含核酸，因此不需要进行此步骤，可以根据需求确定血液起始量直接进行全血裂解（即步骤7）。

3. 在冰上孵育10-15 min，在孵育过程中涡旋振荡混匀2次。

注意：在孵育的过程中溶液将变成半透明状态，表明红细胞裂解。如果必要的话，孵育时间可延长至20 min。

4. 4℃条件下2,100 rpm (~400×g) 离心10 min，将上清完全去除。

注意：离心后白细胞可能会形成小球，确保完全去除上清。痕量红细胞的存在，会使白细胞小球呈现红色，而该现象会在随后的漂洗步骤中消失。

5. 向白细胞沉淀中加入1×红细胞裂解液H（加入1×红细胞裂解液H的体积是第1步中全血用量的2倍），重悬细胞。

6. 4℃，2,100 rpm (~400×g) 离心10 min，将上清完全去除。

7. 向白细胞沉淀中加入裂解液RL（使用前请加入β-巯基乙醇），具体加量按照下表进行，涡旋或使用移液器混匀。

注：如果血液不是健康人的全血，需要根据血液中白细胞的数量来确定所需裂解液RL的体积，此时细胞应完全裂解，块状细胞沉淀消失。

裂解液RL(μl)	健康人类全血(ml)	白细胞数量
400	多至0.5	多至 2×10^6
600	0.5-1.5	2×10^6 至 1×10^7

8. (可选)将溶液转移至过滤柱CS中(过滤柱CS放在收集管中), 12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min, 弃去过滤柱CS, 收集滤液。

注意: 如果存在凝血点或片, 建议进行此步骤, 否则会影响后续核酸与磁珠的结合以及纯化。

9. 取上述滤液加入1倍体积的异丙醇(通常为400 μl或600 μl)和40 μl磁珠悬浮液W, 振荡器混匀5 min, 使磁珠吸附RNA。

10. 将离心管置于磁力架上静置3 min, 磁珠完全吸附后, 小心吸出液体弃去。

11. 将离心管从磁力架上取下, 加入900 μl 去蛋白液 RD (使用前检查是否加入无水乙醇), 振荡混匀2 min。

12. 将离心管置于磁力架上静置3 min, 磁珠完全吸附后, 小心吸出液体弃去, 室温晾干5 min。

13. (可选) 将离心管从磁力架上取下, 进行DNase I 消化:

5 μl DNase I, 70 μl RDD 缓冲液。将配好的工作液加入样本管中, 室温15 min, 期间每5 min颠倒混匀一次。(或者使用振荡器振荡15 min)。

14. 加入700 μl 去蛋白液RD (使用前检查是否加入无水乙醇), 振荡器混匀5 min。

15. 将离心管置于磁力架上静置3 min, 磁珠完全吸附后, 小心吸出液体弃去。

16. 将离心管从磁力架上取下, 加入700 μl 漂洗液RW (使用前检查是否加入无水乙醇), 振荡器混匀2 min。

17. 将离心管置于磁力架上静置3 min, 磁珠完全吸附后, 小心吸出液体弃去。

18. 重复步骤16和17一次。

19. 短暂离心将残余溶液收集至管底, 将离心管置于磁力架上, 吸出所有液体弃去, 室温晾干5 min。

20. 将离心管从磁力架上取下, 加入50-100 μl RNase-Free ddH₂O, 60°C 加热洗脱5 min, 期间颠倒混匀4-5次以充分洗脱RNA(或置于可加热的振荡器上洗脱)。

21. 将离心管放置于磁力架上静置3 min，磁珠完全吸附后，小心将RNA溶液转移至干净的离心管，继续后续实验或保存于-70°C~-80°C。

