

组织RNA抽提试剂盒（磁珠法）使用说明书

【货号】 A2010A101

【规格】 50T

【产品说明】 版本：2020版-01

BioTNT 磁珠法RNA 抽提试剂盒采用国际领先的磁珠法对样本进行抽提，可用于手工抽提RNA，经优化，也可用于多款全自动的磁珠法抽提仪器。

样品经简单预处理后直接提取，以供后续分子检测的应用（PCR, Northern blot, dot blot, 基因芯片, mRNA 表达检测, PCR array, polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等）；可用于人，大鼠，小鼠等各种动物的各类组织样本的RNA 抽提。

优势：

1. 操作快速，简便，容易掌握； 整个实验在30min 内完成；
- 2、RNA 直接可用；提取产物纯度高，片段完整；
- 3、完全去除污染和抑制物；
- 4、与trizol 法和离心柱法相比，显著提高得率，260/280 比率均在1.9-2.0 之间；
- 5、可抽提多达10ug的总RNA。

【实验原理】

样本为10-30mg的人或动物的组织，在加入RNA裂解液和蛋白酶混合液后，匀浆或者裂解，释放出RNA，蛋白被蛋白酶K 消化，加入异丙醇中的特异性磁珠，RNA 被特异性吸附到磁珠上；通过四步洗涤，磁珠被清洗干净；用50-100ul洗脱液洗脱，成为纯净的RNA。与传统的Trizol 法相比，本方法温和，RNA 得率高，RNA 片段完整，5s, 18s 和28s 片段清晰。

【试剂盒组成】：

	试剂名称	规格
101-SR-1	[组织研磨液]	15 mL × 1瓶
101-SR-2	[裂解液]	20 mL × 1瓶
101-SR-3	[蛋白酶混合液]	1mL × 1支
101-SR-4	[洗涤液A]	37.5mL × 2瓶
101-SR-5	[洗涤液B]	6 mL × 2瓶
101-SR-6	[洗脱液]	5mL × 1瓶
101-SR-7	[磁珠悬液]	500μL × 1支

SR-8	无水乙醇	25ml*2瓶
SR-9	异丙醇	20ml*1瓶

【储存条件】：蛋白酶混合液及磁珠悬液2-8℃保存，其余试剂室温（15-25℃）保存，有效期一年。

【实验设备】：漩涡振荡器，离心机或磁力架；

【操作步骤】

未开封的洗涤液 B 使用前需先向试剂瓶中加入 25mL 无水乙醇，充分混匀配置成洗涤液 B 工作液用于常规提取过程，配制完毕后请在瓶身及瓶盖标记“√”。

样本类型	步骤1
固相组织样本	可以用新鲜或冰冻组织样本；或已经浸泡在trizol中的组织；或者是浸泡在核酸保存液中的组织； 取组织10-30mg，加入250-300 μL组织研磨液，用研磨杵将组织彻底研磨（如组织较难彻底研磨，可选用电动匀浆器）；充分研磨至组织研磨液澄清、无可见组织碎片，匀浆液待用。1.5mL离心管中，依次加入400 μL裂解液、200 μL预处理好的组织匀浆液样本、20 μL蛋白酶混合液、异丙醇350 μL和10 μL磁珠悬液，立即高速旋涡震荡10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次），60℃孵育15分钟，期间每隔2分钟上下颠倒离心管10次，始终使管内磁珠分布均匀。室温放置5分钟，期间每隔2分钟上下颠倒离心管10次，始终使管内磁珠分布均匀。

所有样本处理后进入下面步骤：

如果有磁力架，请选择磁力架操作模式Part A；如果您没有配备磁力架，也可以选择离心机的操作模式。本试剂也可以在全自动核酸提取仪上进行操作。

Part A 使用磁力架按照以下进行操作：

1. 将离心管置于磁力架，颠倒混匀，回收管盖残留磁珠，静置30s至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内及管盖液体，注意不能将磁珠吸出。
2. 移去磁力架，加入900μL洗涤液A，低速旋涡震荡10s至其分布均匀后，上下颠倒离心管10-15次充分洗涤。将离心管置于磁力架，颠倒混匀，回收管盖残留磁珠，静置30s至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内及管盖液体，注意不能将磁珠吸出。

3. 移去磁力架，加入600 μ L洗涤液A，低速旋涡震荡10s至其分布均匀后，上下颠倒离心管10-15次充分洗涤，瞬时低速离心，用移液器吹散磁珠后将液体带磁珠全部转移入一干净的1.5mL离心管内。将离心管置于磁力架，颠倒混匀，回收管盖残留磁珠，静置30s至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内及管盖液体，**注意不能将磁珠吸出。**

4. 移去磁力架，加入600 μ L洗涤液B工作液，低速旋涡震荡10s至其分布均匀后，上下颠倒离心管10-15次充分洗涤。将离心管置于磁力架，颠倒混匀，回收管盖残留磁珠，静置30s至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内及管盖液体，**注意不能将磁珠吸出。**

5. 移去磁力架，加入600 μ L洗涤液B工作液，低速旋涡震荡10s至其分布均匀后，上下颠倒离心管10-15次充分洗涤。瞬时低速离心，将离心管置于磁力架上，静置直至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内液体。**特别注意：务必吸尽离心管内残留液体，可以多次吸取液体，但不能将磁珠吸出。**

6. 打开管盖，于室温干燥2-3分钟，至磁珠表面无明显液体。将洗脱液放置于80℃预热（2-3分钟）。

7. 移去磁力架，加入50-100 μ L预热好的洗脱液，用枪头吹吸至磁珠分布均匀或高速涡旋10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次）。80℃温育6分钟，期间每隔1分钟左右摇晃离心管10-15次（切勿颠倒），使管内磁珠始终保持均匀分布的状态。温育结束后，将离心管高速涡旋10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次）。

8. 将离心管置于磁力架上，静置1分钟后，吸取上清到一个无核酶干净的离心管中，此即为纯化后的RNA溶液。液体可以直接进行下面的分子生物学分析，如需检测mRNA，建议直接逆转录得到CDNA，可短期保存于-20℃，长期保存于-70℃。或者-70度保存待用。

PArt B 无磁力架请按照下面进行操作：

- 1) 离心机操作方式：8000 rpm 离心 1min，弃上清。
- 2) 加入 900 μ l 洗涤液 A，用力摇晃离心管 10 次，直至管内磁珠分布均匀；8000 rpm 离心 30s-1min，弃上清。

- 3) 加入 600 μ l 洗涤液 A，用力摇晃离心管 10 次，直至管内磁珠分布均匀；8000 rpm 离心 30s-1min，弃上清。
- 4) 加入 600 μ l 洗涤液 B，用力摇晃离心管 10 次，直至管内磁珠分布均匀；8000 rpm 离心 30s-1min，弃上清。
- 5) 加入 600 μ l 洗涤液 B，用力摇晃离心管 10 次，直至管内磁珠分布均匀；8000 rpm 离心 30s-1min，弃上清。
- 6) 打开管盖，于室温干燥2-3分钟，至磁珠表面无明显液体。将洗脱液放置于80℃预热（2-3分钟）。
- 7) 离心管中加入50-100 μ L预热好的洗脱液，用枪头吹吸至磁珠分布均匀或高速涡旋10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次）。80℃温育6分钟，期间每隔1分钟左右摇晃离心管10-15次（切勿颠倒），使管内磁珠始终保持均匀分布的状态。温育结束后，将离心管高速涡旋10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次）。也可以用更少的量进行洗脱。
- 8) 将离心管置于磁力架上，静置1分钟后，吸取上清到一个无核酶干净的离心管中，此即为纯化后的RNA溶液。液体可以直接进行下面的分子生物学分析，如需检测mRNA，建议直接逆转录得到CDNA，可短期保存于-20℃，长期保存于-70℃。或者-70度保存待用。

【注意事项】

- 1) 说明书中所有黑体字部分都非常重要，不能省略。
- 2) 裂解液必须完全溶解为均一液体，如果出现浑浊或者沉淀，请将其置于37℃孵育直至澄清。
- 3) 样本若以冻存方式保存，避免反复冻融，否则导致提取的核酸片段不完整、且提取量下降。
- 4) 所有吸取上清或倾倒的操作**建议**采用吸取上清的方式，同时注意不能将磁珠吸出。
- 5) 每次洗涤都须将磁珠打散，可低速旋涡震荡或者用移液器轻缓吸打，以保证得到的核酸纯度及片段的完整性。

6) 洗脱结束后的吸磁须充分，避免磁珠残留。

7) 手工提取步骤1和步骤8，可将离心管放置于恒温杂交仪中加热并持续保持混匀，使磁珠均匀分散。

8) 本试剂盒涉及的检测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》相关要求。

【预防RNase污染】

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在裂解液中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4 h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用RNase-Free ddH₂O。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1% (v/v)，混匀后放置过夜，高压灭菌。）

【RNA纯度及浓度检测操作步骤】

完整性： RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳（电泳条件：胶浓度1.2%；0.5×TBE电泳缓冲液；150V，15 min）检测完整性。由于细胞中70%~80%的RNA为rRNA，电泳后UV下应能看到非常明显的rRNA条带。28S rRNA的量约为18S rRNA的两倍，说明RNA的完整性较好。

纯度： OD260/OD280比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA，OD260/OD280读数在1.8~2.1之间，比值为2.0是高质量RNA的标志。OD260/OD280读数受测定所用溶液的pH值影响。同一个RNA样品，假定在10 mM Tris，pH7.5溶液中测出的OD260/OD280读数1.8~2.1之间，在水溶液中所测读数则可能在1.5~1.9之间，但这并不表示RNA不纯。

浓度： 取一定量的 RNA 提取物，用RNase-Free ddH₂O稀释 n 倍，用RNase-Free ddH₂O将分光光度计调零，取稀释液进行OD260，OD280测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD260}) \times (\text{稀释倍数}n) \times 40$$

可以使用nano drop等核酸检测仪器，以及 Aglient 2000 检测RNA 含量，纯度和完整度。

对于不同的组织样本，得到的RNA产量和纯度会有差异，通常10~30mg小鼠肝脏、肾脏组织样本，RNA产量10 μg 以上；OD260/280：2.0左右，OD260/230：1.8以上。

品质保证： 所有产品由 BioTNT 进行品质保证。如果客户使用中有任何问题，都可以联系 BioTNT 公司。