

细胞RNA抽提试剂盒（磁珠法）使用说明书

【货号】A2010A104

【规格】50T

【产品说明】版本：2024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细胞样本的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】

本试剂盒用于从1000-5×10⁶个动物或人源细胞中提取、纯化RNA，提取产物纯度高、片段完整，适用于分子生物学研究及下游应用。

细胞在加入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	保存条件
[细胞处理液]	10mL×1瓶	室温（15-25℃）
[裂解液]	20mL×1瓶	室温（15-25℃）
[洗涤液A]	37.5mL×2瓶	室温（15-25℃）
[洗涤液B]	30mL×2瓶	室温（15-25℃）
[洗脱液]	5mL×1瓶	室温（15-25℃）
[蛋白酶混合液]	1mL×1支	2-8℃
[磁珠悬液]	500 μL×1支	2-8℃

【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。

【需要使用但未提供的试剂】：1×PBS缓冲液，异丙醇

【实验设备】：漩涡振荡器，离心机或磁力架；

【样本要求】

新鲜培养的动物或人源细胞悬液，细胞数量不超过 5×10^6 个。

【样本预处理】

1. 取1000- 5×10^6 个动物或人源细胞，1000rpm离心5min，充分收集细胞。
2. 去除细胞培养液，加入500 μ L 1×PBS重悬洗涤1次，再次离心收集细胞。
3. 充分去除上清，在细胞沉淀中加入200 μ L细胞处理液，用吸头反复吹打至细胞充分分散，细胞处理液中无可见细胞沉淀，室温放置待用。
4. 注：贴壁细胞应先处理为细胞悬液。

【操作步骤】

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；如果您没有配备磁力架，所有的使用磁力架步骤，可以更换为：

离心机分离标准操作：8000rpm离心1min，弃上清。

本试剂也可以在全自动核酸提取仪上进行操作。

使用磁力架按照以下进行操作：

1 1.5mL离心管中，依次加入400 μ L裂解液、200 μ L已处理好的待提取细胞样本，20 μ L蛋白酶混合液，立即高速漩涡震荡10-15次（溶液完全涡旋震荡），60℃孵育20分钟，期间每隔1分钟上下颠倒离心管10次。加入350 μ L异丙醇和10 μ L磁珠悬液，室温放置10分钟，期间每隔1分钟上下颠倒离心管10次，始终使管内磁珠分布均匀。

2 执行磁力架分离标准操作：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900 μ L洗涤液A，低速漩涡震荡10s至其分布均匀后，上下颠倒离心管10-15次充分洗涤。执行磁力架分离标准操作。

4 移去磁力架，加入600 μ L洗涤液A，低速漩涡震荡10s至其分布均匀后，上下颠倒离心管10-15次充分洗涤。执行磁力架分离标准操作。

5 移去磁力架，加入600 μ L洗涤液B工作液，用移液器吹散磁珠后将液体带磁珠全部转移入新的离心管内。执行磁力架分离标准操作。

6 移去磁力架，加入600 μ L洗涤液B工作液，低速漩涡震荡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，执行磁力架分离标准操作。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。

7 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）。

8 移去磁力架，加入50-100 μL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10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）。

9 将离心管置于磁力架上，静置直至磁珠全部吸附到管壁，吸取上清到一个无核酶干净的离心管中，此为纯化后的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】

经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。

使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。

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4h，塑料器皿可在0.5M NaOH中浸泡10min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。

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，15min）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。28SrRNA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10mM 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Aglient2000检测RNA含量，纯度和完整度。

对于不同的细胞样本，得到的RNA产量和纯度会有差异。通常 1×10^6 个新鲜收集的THP-1细胞系样本，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。