GenePharma

# 磁珠法总RNA 提取试剂盒 (细胞)

B015-V001G-20200323

Magnetic Total RNA Kit (cell)

## 产品简介

本试剂盒采用具有独特分离作用的超顺磁珠和独特的缓冲液系统，从各类细胞中分离纯化高质量总RNA。样品中的核酸在裂解液作用下被释放出来，在裂解液的存在下，释放出来的核酸特异性的结合在特殊包被的超顺磁珠上，在外加磁场的吸附下，轻松完成对核酸的吸附固定，通过几次的洗涤过程将污染物除去，最后在RNA洗脱液的作用下核酸从磁珠上洗脱下来，同时DNA被DNase I消化，纯化后得到总RNA。整个过程不带来抑制物，不需要离心，高质、便捷、快速，提取的RNA得率高，纯度高，质量稳定可靠，尤其适合高通量工作站的自动化提取。

使用本试剂盒纯化的RNA可适用于各种常规操作，包括测序、酶切、RT-PCR、文库构建等实验。

## 试剂盒组成

| 产品组成 | 24rxns | 48 rxns | 96 rxns |
|---|---|---|---|
| Buffer CRL | 10mL | 20mL | 40mL |
| 磁珠悬浮液 (MB) | 0.8mL | 1.5mL | 3mL |
| Buffer CRW 0 | 30mL | 60mL | 120mL |
| Buffer CRW I | 15mL | 25mL | 50mL |
| DNase I 缓冲液 | 0.9 mL | 1.8 mL | 3.6mL |
| DNase I | 0.8 mL | 1.5mL | 3mL |
| 洗脱液 (EB) | 3 mL | 6 mL | 12 mL |
| β-巯基乙醇 | 0.2mL | 0.4mL | 0.8mL |

## 保存条件

DNase I 、DNase I 缓冲液：-20℃；

磁珠悬浮液：4℃；其它组分：室温，可稳定保存12 个月

## 适用范围

培养细胞：$5\times10^{1}$-$5\times10^{7}$个

## 注意事项

- 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的RNA降解且提取量也下降；
- 需要自备材料：无水乙醇、PBS缓冲液、磁铁或磁架、无RNase离心管；
- 整个过程请勿离心，以免磁珠不可逆聚集而影响提取效果。
- 全程使用无RNase的塑料制品和枪头，操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套；
- 玻璃器皿应在使用前于180℃高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌

## 实验准备

- 磁珠用前一定要充分混匀；
- 37℃和56℃加热源；
- Buffer CRL在使用前应加入2%的β-巯基乙醇（例如单个反应400 μl Buffer CRL，应加入8 μl β-巯基乙醇，充分混匀备用），且现配现用；
- 配制Buffer CRW I：Buffer BRW I 使用前加入相应体积的无水乙醇；
- 配制DNase I 反应液：对于单个样品，取10 μl洗脱液(EB)，向其中加入35 μl DNase I缓冲液和30 μl DNase I，最终配置成终体积为75 μL的反应液(置于4℃备用)，按照样品的数量按比例放大。
- 收集细胞PBS洗两次，沉淀备用；

## 操作步骤

1. **样本前处理：**细胞用PBS洗两次后，沉淀备用；

2. **裂解结合：**在细胞沉淀中，加入400 μl Buffer CRL重悬细胞、400 μl异丙醇和30 μl磁珠，颠倒混匀，室温放置10分钟（期间不时颠倒混匀，重悬磁珠），将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体。；

**注意：如果改变样品使用量，裂解液、磁珠悬浮液和异丙醇醇的使用量也需要按比例做相应的调整。**

3. **漂洗：**

(1)将离心管从磁力架上取下，向离心管中加入500 μl Buffer CRW 0, 轻微振荡混匀（或用移液器吹打混匀）, 重悬磁珠，将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体；

(2) 向离心管中加入500 μl Buffer CRW I, 轻微振荡混匀（或用移液器吹打混匀）, 重悬磁珠，将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体, 重复上述洗涤步骤1次，第二次洗涤待磁珠完全吸附后充分吸弃液体**（不要有残留）**，室温晾干5-10min。

**注意：要将上清尽量弃净，乙醇晾干，以免影响DNase I消化效果**

4. **DNA消化：**将离心管从磁力架上取下，向离心管中加入75 μl DNase I 反应液，移液器吹打重悬磁珠，37℃孵育15分钟, 每隔5分钟轻弹管底悬浮磁珠，以防磁珠成团。

5. **漂洗：**

(1)将离心管从37℃加热器上离开，加入700 μl Buffer CRW 0，移液器吹打重悬磁珠，室温颠倒混匀5分钟，将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体；

(2) 加500 μl Buffer CRW I, 轻微振荡混匀（或用移液器吹打混匀）, 将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体；

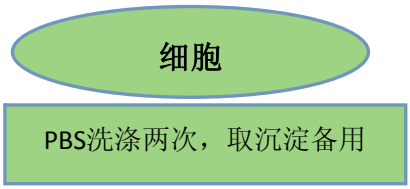
(3) 再次加入500 μl Buffer CRW I，轻微振荡混匀（或用移液器吹打混匀）, 请注意将磁珠聚集在管底, 待磁珠完全吸附后吸弃液体，室温晾干2min。

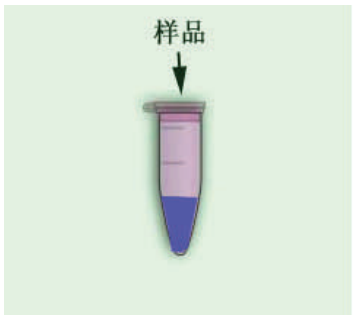
6. **洗脱：** 将离心管从磁力架上取下，向离心管中加入50-100 μl 洗脱液 EB，56℃孵育5分钟，将离心管重新放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后小心将总RNA溶液转移至新的离心管，放入-80 ℃保存备用。

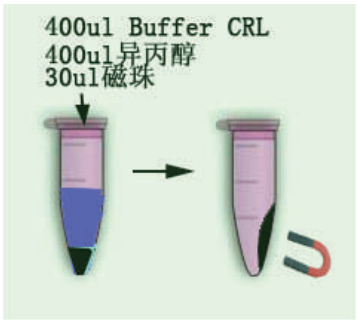
## 纯度效果评价

通过测定洗脱液中RNA的A260来确定RNA产量，通常情况下A260值在 0.1～1.0之间数据比较可信。如果不在此范围内，请稀释或浓缩样品调整；通过测定洗脱液中RNA的A280和A230来确定RNA纯度，A260/A280比值在1.8-2.0之间，小于1.8表示可能有蛋白质污染，A260/A230应该大于2.0，太小表示有盐离子残留。

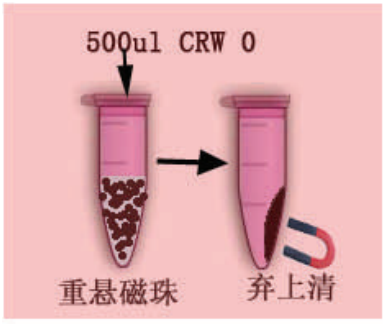
# 操作简图



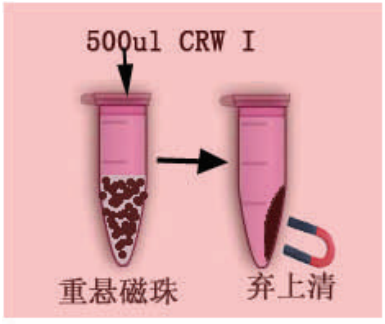



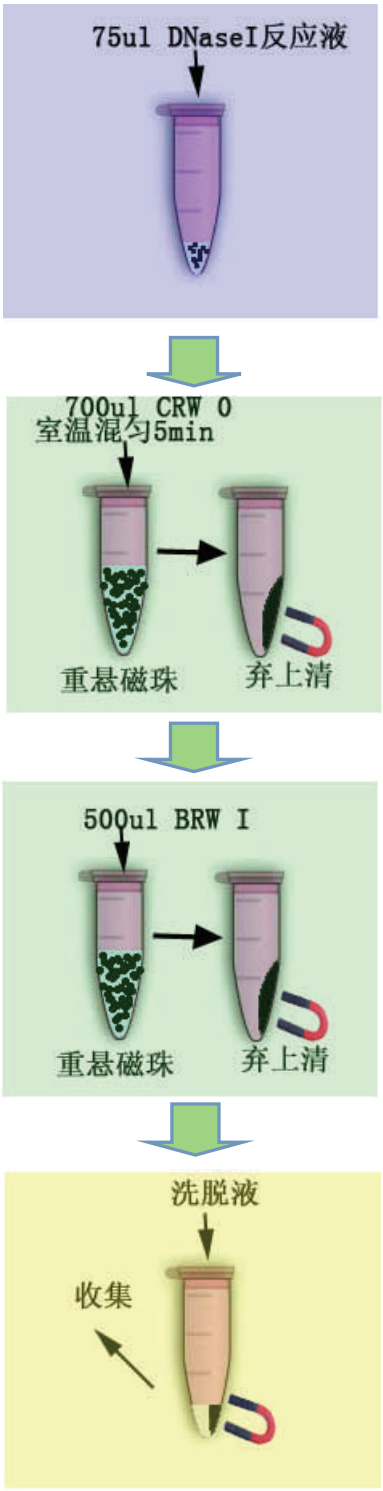

**裂解、结合**：加入相应体积的Buffer CRL、异丙醇和磁珠，颠倒混匀，室温放置10min（期间不时颠倒混匀磁珠）；于磁力架上吸弃上清。




**洗涤Ⅰ**：加入500 μl buffer CRW 0，吹散磁珠，再次置于磁力架上，吸弃上清。




**洗涤Ⅱ**：于磁力架上吸弃上清，加入500 μl buffer CRW Ⅰ，吹散磁珠，再次置于磁力架上，吸弃上清，重复该步骤一次，室温晾干5-10min。




**消化DNA**：加入相应体积的的DNaes I 消化液，吹散磁珠，37℃放置15min，期间不时轻弹混匀磁珠。

**再次结合**：加入相应体积的Buffer CRW 0，颠倒混匀5min，于磁力架上吸弃上清。

**洗涤III**：加入500 µl buffer CRW I，吹散磁珠，再次置于磁力架上，吸弃上清，重复该步骤一次，室温晾干2min。

**洗脱**：加入50-100 µl Buffer EB ，尽量吹散磁珠，室温放置5min，吸上清到干净离心管中保存。