



GenePharma

磁珠法总RNA 提取试剂盒 (新鲜组织/冰冻组织)

B015-V001E-20200323

Magnetic Total RNA Kit (fresh tissue/frozen tissue)

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，从新鲜组织或冰冻组织分离纯化高质量总RNA。样品中的核酸在裂解液的作用下被释放出来，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，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	24 rxns	48 rxns	96 rxns
裂解液 (Buffer TRL)	13mL	25mL	50mL
磁珠悬浮液 (MB)	0.8mL	1.5mL	3mL
Buffer TRW 0	30mL	60mL	120mL
Buffer TRW I	15mL	25mL	50mL
DNase I 缓冲液	0.9mL	1.8mL	3.6mL
DNase I	0.8mL	1.5mL	3mL
洗脱液 (EB)	3mL	6mL	12mL
β -巯基乙醇	0.3mL	0.5mL	1mL

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

新鲜组织或冰冻组织：10-50mg

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、磁铁或磁架；
- ◆ 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

- ◆ Buffer TRL在使用前应加入2%的 β -巯基乙醇（例如单个反应500 μ l Buffer TRL，应加入10 μ l β -巯基乙醇，充分混匀备用），且现配现用。
- ◆ 磁珠使用前一定要充分混匀；
- ◆ 37℃加热源，液氮；
- ◆ 将Buffer TRWI使用前加相应体积的无水乙醇并充分混匀；
- ◆ 配制DNase I 反应液：对于单个样品，取10 μ l洗脱液(EB)，向其中加入35 μ l DNase I 缓冲液 和30 μ l DNase I，最终配置成终体积为75 μ L的反应液，按照样品的数量按比例放大（在冰盒上进行操作）。

操作步骤

1. 裂解：组织应先在液氮环境中磨碎，立即转移到含有500 μ l Buffer TRL的离心管中(若有匀浆机，组织液氮研磨后，在500 μ l BufferTRL中用匀浆机将组织彻底磨碎，效果更佳)，吹打混匀，使组织溶解,室温放置5min；

注意：①如果有组织为未溶解可以6000rpm离心2min，取上清进行下步操作。

2. 结合：加入500 μ l异丙醇和30 μ l磁珠，室温颠倒混匀10min，使磁珠充分与核酸结合。将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体（不要吸弃磁珠）。

3. 漂洗：

(1)将离心管从磁力架上取下，向离心管中加入500 μ l Buffer TRW 0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；

(2)加入500 μ l Buffer TRW I，将离心管放置于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体，重复该步骤一次，第二次注意要将上清充分弃尽，晾干5-10min。

注意：要将上清尽量弃净，以免影响DNase I消化效果

6. DNA消化：将离心管从磁力架上取下，向离心管中加入75 μ l DNase I 反应液，37℃孵育15分钟,每隔3分钟轻弹管底悬浮磁珠，以防磁珠成团。

7. 漂洗：

(1)将离心管从37℃加热器上离开，加入700 μ L Buffer TRW 0重悬磁珠，室温颠倒混匀5分钟，将离心管放于磁力架上，待磁珠完全吸附后吸弃液体；

(2)加500 μ l Buffer TRW I,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；

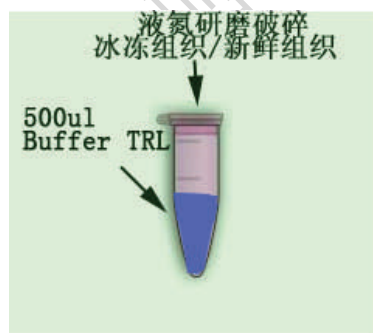
(3)再次加入500 μ l Buffer TRW I，振荡混匀, 请注意将磁珠聚集在管底,待磁珠完全吸附后，彻底吸弃液体，室温晾干2min。

8. 洗脱：将离心管从磁力架上取下，向离心管中加入50-100 μ l 洗脱液 EB，室温放置5分钟，期间不时轻弹混匀磁珠，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。

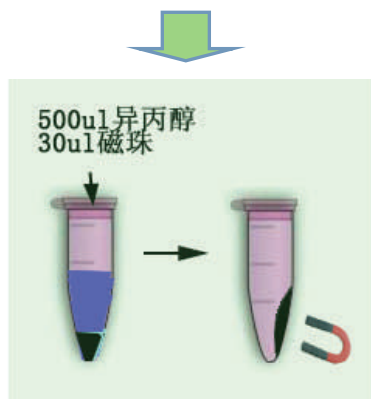
纯度效果评价

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。

操作简图



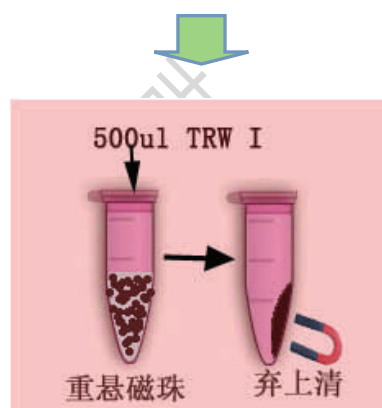
裂解：液氮磨碎组织，加入相应体积的Buffer TRL，吹打溶解组织，放置5min。



结合：加入相应体积的异丙醇和磁珠，颠倒混匀10min，于磁力架上吸弃上清。



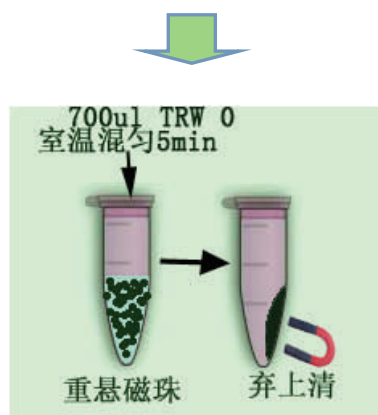
洗涤I：加入 50 μ l buffer TRW 0，**吹散磁珠**，再次置于磁力架上，吸弃上清。



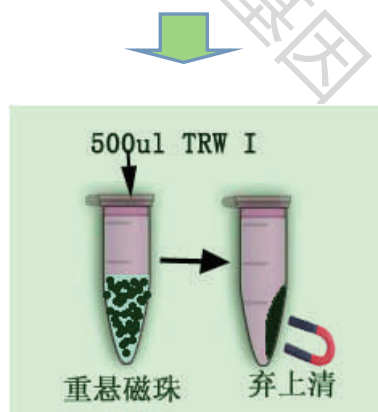
洗涤II：于磁力架上吸弃上清，加入500 μ l buffer TRW I，**吹散磁珠**，再次置于磁力架上，吸弃上清，**重复该步骤一次**，室温晾干5-10min。。



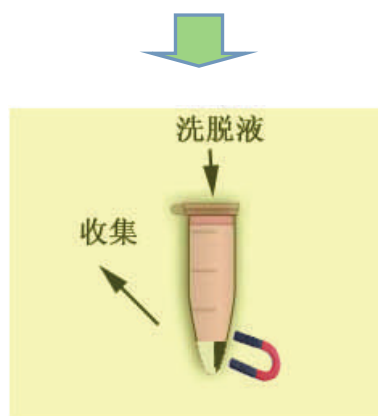
消化DNA：加入相应体积的DNase I 消化液，吹散磁珠，37℃放置15min，期间不时轻弹混匀磁珠。



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



洗涤III：加入500 μl buffer TRW 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。