

试剂盒1

【产品名称】

商品名称：磁珠法细胞/组织/血液总RNA提取试剂盒

【包装规格及适配仪器】

预分装：16T(适配 16通道全自动核酸提取仪)

预分装：96T(适配96通道全自动核酸提取仪)

非预分装：20T、100T、500T(手工提取和其他全自动核酸提取仪)

【预期用途】

用于高通量全自动化核酸的提取、富集、纯化等步骤，其处理后的产物用于科研检验。

【检验原理】

本试剂盒是基于高特异结合力生物纳米磁珠的核酸提取试剂盒，主要原理是利用功能性生物磁珠表面的功能基团，将核酸从样品裂解产物中富集至磁珠表面，并经洗涤液去除蛋白质和其他杂质，再利用磁性分离装置对磁珠进行分离，然后经DNase I 消化去除DNA，从而快速分离纯化RNA。整个过程不需要用到苯酚、氯仿和β-巯基乙醇等有害物质，安全无毒，并且利用具有顺磁性的生物纳米磁珠，适合高通量自动化提取，提取产物可直接用于RT-PCR、qRT-PCR、Northern Blot、二代测序建库和分子克隆等下游实验。

【主要组成成分】

非预分装 产品货号	-20	-100	-500	预分装 产品货号	-16		-96
规格	20 T	100 T	500 T	规格	16 T	16 T *6	96 T
裂解液A	11 mL	55 mL	275 mL	裂解液A	11 mL	55 mL	55 mL
裂解液B	11 mL	55 mL	275 mL	裂解液B	11 mL	55 mL	55 mL
结合液	10 mL	45 mL	225 mL	结合液	96孔板*1	96孔板*6	96孔板*1
洗涤液 I	20 mL	90 mL	450 mL	洗涤液 I			96孔板*1
洗涤液 II	20 mL	90 mL	450 mL	磁珠+洗涤液 II			96孔板*1
洗涤液 III	20 mL	90 mL	450 mL	洗涤液 III			96孔板*1
磁珠	220 μL	1.1 mL	1.8 mL*3	洗脱液			96孔板*1
DNase I	80 μL	220 μL*2	1 mL*2	DNase I	80 μL	220 μL*2	220 μL*2
DNase I Buffer	1.25 mL*2	12 mL	55 mL	DNase I Buffer	2 mL	12 mL	12 mL
洗脱液	4 mL	20 mL	60 mL	洗脱液	2 mL	2 mL	2 mL

选配试剂：蛋白酶K、DNase I（提取血液样本时标准分装量不够）。

【储存条件及有效期】

DNase I：-20 ℃保存，干冰或湿冰运输；

DNase I Buffer 和磁珠：4 ℃长期保存，常温或湿冰运输；

其他试剂：常温保存和运输。

试剂盒有效期为12个月。

【样本类型】

本试剂盒主要适用于 10^3 - 10^7 个细胞量的各种动物培养细胞、新鲜及冻存的动物组织以及新鲜血液样本的总RNA提取。

【提取方案】

【实验前试剂准备】

根据样品数量，配制相应体积的DNase I 反应液（单个反应配制用量如下表1所示），分装到相应工位的96孔板中。DNase I 反应液尽量现用现配，避免酶活性降低。

表1. DNase I 反应液配制

试剂	单个反应用量	
	提取细胞/组织	提取血液（1 mL）
DNase I	4 μ L	10 μ L
WRB Buffer 1	96 μ L	90 μ L

【样本裂解和匀浆】

样本种类	样本状态	样本量	裂解液用量	样本处理（样本匀浆获取）
细胞	悬浮细胞	$\leq 10^7$	裂解液A 500 μ L	取适量新鲜细胞悬浮液至1.5 mL离心管，4 $^{\circ}$ C，600 $\times$ g离心5 min，弃尽上清后用推荐用量裂解液反复吹打来重悬裂解细胞或涡旋混匀裂解细胞至匀浆澄清透明。
	贴壁细胞	96孔板培养贴壁细胞	裂解液A 150 μ L	单层贴壁细胞弃尽培养基上清，用1 $\times$ PBS洗去残留培养基避免影响下游反应，之后可在培养皿中直接加裂解液进行裂解： a，细胞数 $\leq 10^7$ ，可加推荐用量裂解液反复吹打使细胞脱落并裂解； b，细胞数 $> 10^7$ ，需用胰酶消化后用PBS重悬，取一定数量细胞悬浮液，按照悬浮细胞处理方法裂解即可。
	Trizol保存细胞匀浆	≤ 300 μ L	裂解液B 补充至总体积 =500 μ L	新鲜培养细胞，一般 10^5 - 10^7 细胞加1 mL Trizol，混匀后立即冻存于-80 $^{\circ}$ C待用。使用时，取 ≤ 300 μ L Trizol保存的细胞匀浆，补充裂解液至终体积500 μ L后充分混匀。

组织 新鲜 或 冻存 样品	正常组织 或 保存液 保存组织	推荐用量： ≤20 mg	裂解液B 500 μL	1. 干磨组织 a, 在液氮保持的低温环境下用研钵研磨组织至粉状； b, 或称10-20 mg剪成条状或片状的组织块投入2 mL离心管内，加入3颗5 mm钢珠，并立即置于液氮中冷却，60 Hz研磨30 s（搭配液氮预冷金属模块）至组织呈粉末状，直接向离心管中加入500 μL裂解液B（温度过低液体会冻住，可摇晃离心管使其迅速融化），立即振荡混匀2 min至管内无明显块状/絮状组织颗粒，（心脏、肌肉等蛋白含量较高的组织及脂肪和脑组织可在裂解后加入0.2 mg蛋白酶K/样本，即每个样本加入10 μL浓度为20 mg/mL的蛋白酶K，充分混匀后静置2-3 min）随后，4 °C，16000 × g离心5 min，取上清进行后续提取。 2. 湿磨组织 称10-20 mg剪成条状或片状的组织块投入2 mL离心管内，立即加入500 μL裂解液B和3颗5 mm钢珠，60 Hz研磨30 s，（心脏、肌肉等蛋白含量较高的组织及脂肪和脑组织需在研磨后加入0.2 mg蛋白酶K/样本，充分混匀后静置2-3 min）随后，4 °C，16000 × g离心5 min，取上清进行后续提取。 3. 保存液保存组织 从保存液中取出组织，用干净吸水纸吸干液体，剪成条状或片状的组织块后像正常组织一样进行干磨或湿磨处理即可。
	冷冻切片组织	≤10片 切片厚度 4-20 μm	裂解液B 500 μL	取冷冻组织切片至液氮预冷的离心管中，立即加入500 μL裂解液B，迅速涡旋振荡或用移液器吹打混匀至无明显絮状沉淀，4 °C，16000 × g，离心5 min，取上清进行后续提取。 针对无参考范围的组织，推荐初次提取切片厚度10 μm，切片数为2片，再根据RNA提取得率进行调整。
血液 新鲜	白细胞沉淀	1-1.5 mL 新鲜全血 裂红后收 集的白细 胞沉淀	裂解液A 500 μL	1. 红细胞裂解：取1-1.5 mL新鲜全血，加入3倍体积（3-4.5 mL）红细胞裂解液，轻柔颠倒混匀，冰上静置15 min，期间轻柔颠倒混匀两次（红细胞裂解后，溶液应该是清亮透明的）；4 °C，450 × g离心10 min，小心吸弃上清。 2. 白细胞收集：再加入2倍体积（2-3 mL）红细胞裂解液，轻柔吹打重悬白细胞；4 °C，450 × g离心10 min沉淀白细胞，小心并彻底吸弃上清后获得白细胞沉淀。 3. 白细胞裂解：加入500 μL裂解液，涡旋混匀后加入60 μL浓度为20 mg/mL的蛋白酶K，涡旋混匀30 s-1 min至无明显细胞团块即可。

【手动提取】

- 按照样本预处理步骤对不同样品进行处理，得到裂解后的样品匀浆液。
 - 加入400 μL 结合液，颠倒混匀6-8次，再加入10 μL磁珠（使用前务必混匀），涡旋振荡混匀10 min。
- 注：当细胞数或组织样品量较多时，核酸量较高，此步骤加入结合液混匀后会有絮状沉淀产生，属于正常现象。
- 离心管瞬离5 s（避免管盖液体残留）后置于磁力架上，静置10 s，待磁珠完全被磁力架吸附后，吸尽管中液体并弃去。
 - 将离心管从磁力架取出，加入800 μL洗涤液 I，涡旋振荡混匀5min，离心管瞬离5 s后置于磁力架上，静置10 s，待磁珠吸附聚集后，吸尽管中液体并弃去。
 - 将离心管从磁力架取出，加入800 μL洗涤液 II，涡旋振荡混匀5 min，离心管瞬离5 s后置于磁力架上，静置10 s，待磁珠吸附聚集后，吸尽管中液体并弃去，开盖晾干2 min。

6. 向离心管中加入100 μL 配制好的DNase I 反应液，吹打混匀重悬磁珠，室温放置15 min（期间每隔5 min用手指拨动离心管底部，使磁珠与反应液充分混合）。消化结束，将离心管瞬离5 s后置于磁力架上，静置10 s，待磁珠吸附聚集后，吸尽管中液体并弃去。

注：提取血液样本时，试剂盒中DNase I 标准分装量不够，需另购DNase I。

7. 将离心管从磁力架取出，加入800 μL 洗涤液 III，涡旋振荡混匀5 min，离心管瞬离5 s后置于磁力架上，静置10 s，待磁珠吸附聚集后，吸尽管中液体并弃去。

8. 无需将离心管从磁力架中取出，开盖室温静置4 min，磁珠充分晾干后，加入30-100 μL 洗脱液将离心管壁的磁珠冲洗至管底，60 $^{\circ}\text{C}$ 加热振荡混匀5 min。离心管瞬离后置于磁力架上，静置10 s，待磁珠吸附聚集后，小心吸出管中液体（即为RNA样品），转移至RNase-free 的干净离心管中，-20 $^{\circ}\text{C}$ 短期保存，-80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

注：a. 为避免每一步操作残留液体对下一步洗涤或洗脱的影响，离心管置于磁力架前可瞬离5 s以除去离心管盖上残留液体；b.涡旋振荡混匀的力度以使磁珠重悬并充分分散为标准。

【自动提取（16通道设备以1和5通道加热为例）】

1. 打开仪器电源，待仪器完成自检后，按对应的仪器型号设置程序参数（详见表3、4）。
2. （预分装试剂省略此步）非预分装试剂请先将各组分（使用前务必充分摇匀）按照下表进行分装：

表2. 不同试剂分装量及对应布板位/工位

组分名称	试剂分装量	16T-布板	96T-工位
结合液	400 μL /孔	1/7列	工位1
洗涤液 I	800 μL /孔	2/8列	工位2
磁珠+洗涤液 II	10 μL +800 μL /孔	3/9列	工位3
DNase I 反应液	100 μL /孔	4/10列	工位4
洗涤液 III	800 μL /孔	6/12列	工位5
洗脱液	30-100 μL /孔	5/11列	工位6

注：洗脱液用量可依据下游实验对RNA产物浓度要求自行调整，但实际洗脱体积不应低于30 μL ，否则洗脱不充分。

3. 预分装试剂：轻甩孔板，使试剂和磁珠集中到孔板底部（也可用孔板离心机，500 rpm 离心1 min）。小心撕去封口膜（避免液体溅出）。将配制好的DNase I 反应液加入到16T-布板的第4/10列（16通道提取仪）或96T-工位4对应的96孔板（96通道提取仪）中。

注：提取血液样本时，试剂盒中DNase I 标准分装量不够，需自备。

4. 按样本裂解和匀浆方案处理样本并将样本匀浆转移至第1/7列（16通道提取仪）或工位1对应的96孔板（96通道提取仪）中。

5. 将96孔板放入仪器对应卡槽中，插入磁棒套，关闭舱门，开始运行程序。

6. 程序结束后，仪器会自动停止，第5/11列孔16通道提取仪）或工位6的96孔板（96通道提取仪）中产物即为提取的核酸样品，将样品转移至RNase-free的干净离心管中，-20 $^{\circ}\text{C}$ 短期保存，-80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

表3. 16通道全自动核酸提取仪细胞/组织/血液总RNA提取参考程序

步骤	第1步	第2步	第3步	第4步	第5步	第6步	第7步	第8步
工位	3	1	2	3	4	6	5	3
等待时间	0	0	0	0	30s	0	180s	0
混合模式	慢速	中速	中速	中速	慢速	中速	慢速	慢速

混合时间	30s	600s	120s	120s	900s	120s	300s	10s
吸磁时间	60s	30s	30s	30s	60s	60s	30s	0
体积	800 μ L	900 μ L	800 μ L	800 μ L	100 μ L	800 μ L	100 μ L	800 μ L
温度c	--	25 $^{\circ}$ C	--	--	--	--	70 $^{\circ}$ C	--

表4. 96通道全自动核酸提取仪细胞/组织/血液总RNA提取参考程序

步骤	第1步	第2步	第3步	第4步	第5步	第6步	第7步	第8步
工位	3	1	2	3	4	5	6	3
等待时间	0	0	0	0	30s	0	180s	0
混合模式	慢速	中速	中速	中速	慢速	中速	慢速	慢速
混合时间	30s	600s	120s	120s	900s	120s	300s	10s
吸磁时间	60s	30s	30s	30s	60s	60s	30s	0
体积	800 μ L	900 μ L	800 μ L	800 μ L	100 μ L	800 μ L	100 μ L	800 μ L
温度c	--	25 $^{\circ}$ C	--	--	--	--	70 $^{\circ}$ C	--

【注意事项】

1. RNA提取实验中应全程避免RNase污染
 - (1) 注意勤换手套，避免皮肤表面的RNase导致样品RNA的降解。
 - (2) 使用RNase-free的枪头等塑料制品。
 - (3) 若提取过程中需要用到其他玻璃器皿，可在150 $^{\circ}$ C烘烤4-6 h。
2. RNA产量和纯度问题
 - (1) 磁珠需充分晾干，否则会影响A260/A230的比值。
 - (2) 可根据样本量适当调整洗脱液体积，提取微量细胞时可适当减少洗脱体积来增加浓度。但是洗脱体积低于30 μ L会导致磁珠无法完全重悬，洗脱不充分，RNA得率降低。
 - (3) 提取细胞RNA请尽量使用新鲜样本，冻存样本应避免反复冻融。
 - (4) 提取动物组织总RNA尽量在液氮保持的低温环境下处理样本。
3. 提取大于 5×10^6 细胞量细胞RNA时，加入裂解液裂解后，裂解匀浆比较粘稠，为方便吸取样品可选择剪掉枪头尖端部分，或直接将裂解匀浆倒入深孔板对应孔位中进行结合反应。后续提取不受影响。
4. 本试剂盒仅适用于新鲜血液总RNA提取，不适用冻存血。

生产企业：
生产地址：
邮编：
电话：
网址：
邮箱：

【说明书核准及修改日期】2025.07.10

【版本号】 V1.0

数据

1. 细胞总RNA提取结果比较

(1) 不同试剂盒提取梯度数量细胞总RNA得率对比

表1 不同细胞起始量对应RNA获得量对比总结

细胞数对应RNA获得量 (μg) 试剂盒及提取方法	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	5×10 ³	2×10 ³
本试剂盒	28	5	0.68	0.37	0.18
QXX	14	3	0.62	0.25	0.14
TXX	23	4	0.53	0.22	0.12
Trizol法	18	3	0.26	0.13	0.07

注：细胞样本以293F细胞为例，产量为多次实验平均值。

(2) 不同试剂盒提取细胞总RNA及其下游实验验证分析

以293T细胞为例，选取3×10⁵细胞量提取RNA产物进行琼脂糖凝胶电泳和毛细管电泳分析。通过比较，本试剂盒提取细胞总RNA效果在浓度、纯度、完整度，均优于其他试剂盒。

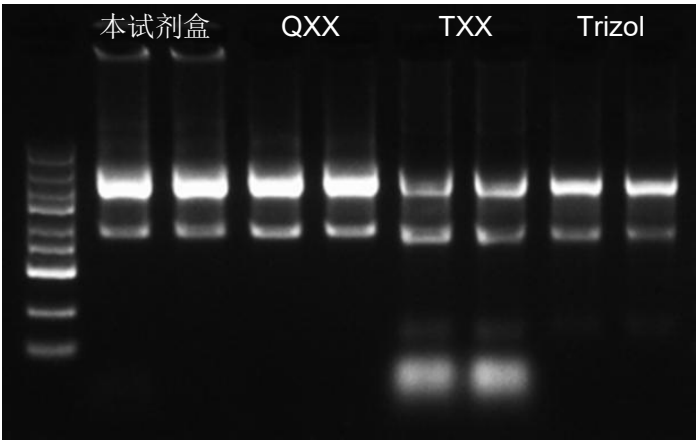


图1 各试剂盒提取293T细胞总RNA琼脂糖凝胶电泳

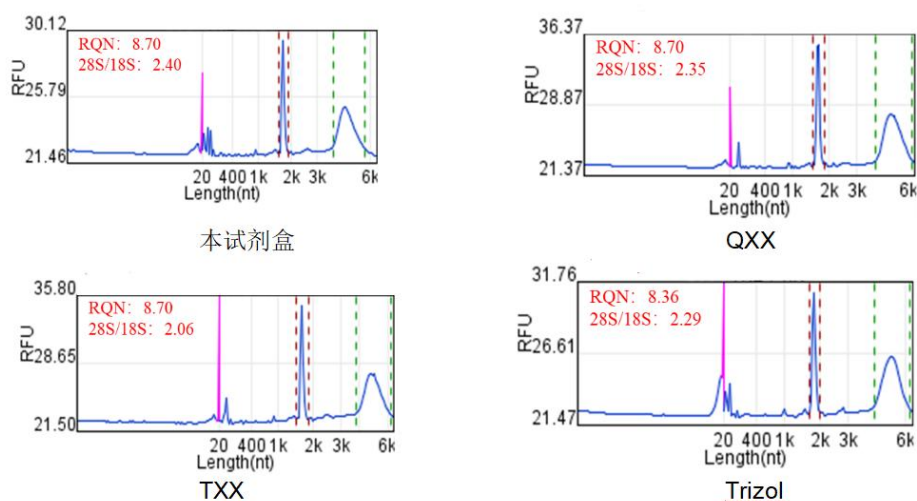


图2 各试剂盒提取293T细胞总RNA毛细管电泳

2. 动物组织总RNA提取结果比较

选取小鼠不同组织，用本试剂盒及其他试剂盒提取组织总RNA，提取产物进行琼脂糖凝胶电泳和毛细管电泳分析。通过比较，本试剂盒提取组织RNA效果在浓度、纯度、完整度均优于其他试剂盒。

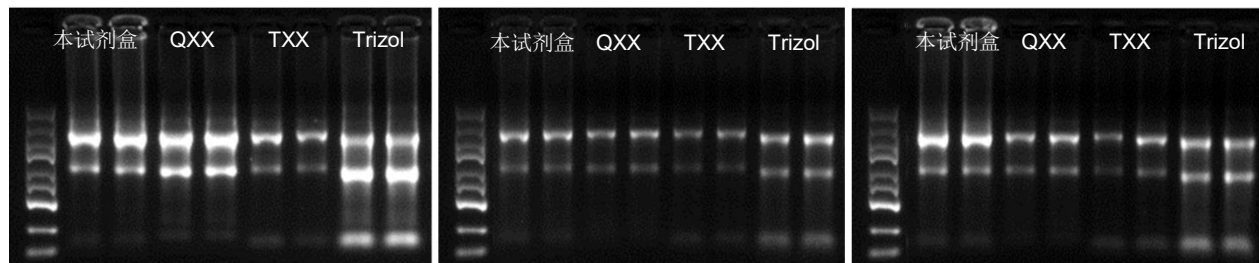


图3 各试剂盒提取不同组织总RNA琼脂糖凝胶电泳

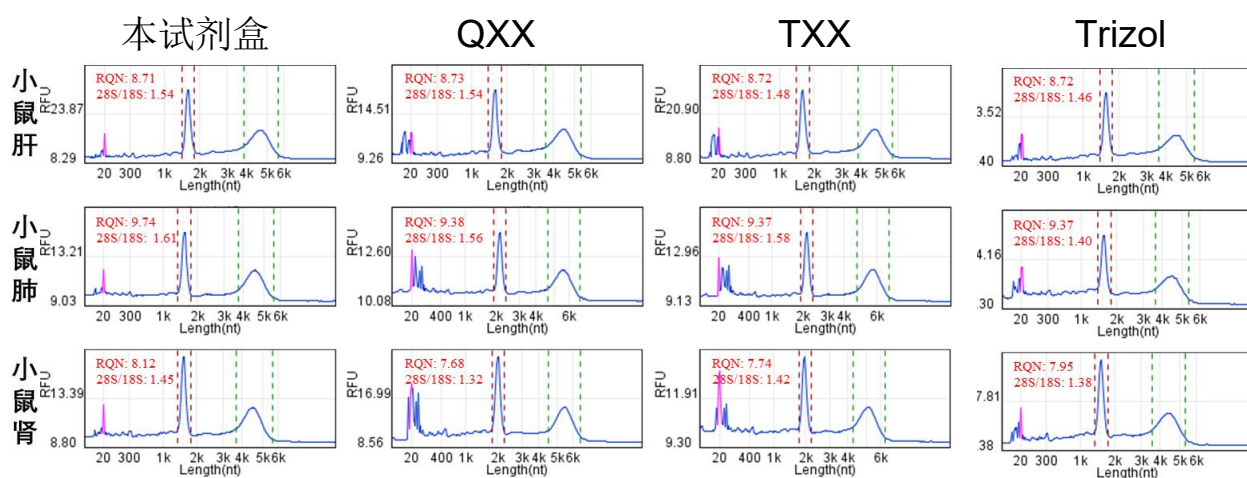


图4 各试剂盒提取不同组织总RNA毛细管电泳