

# SteadyPure Mag 组织 & 细胞 RNA 提取试剂盒 (磁珠法)

SteadyPure Mag Tissue & Cells RNA Extraction Kit

Code No. AG21203

**包装量:** 50 rxns  
**保存温度:** Package 3-1 4°C  
 Package 3-2 4°C  
 Package 3-3 室温 (15 ~ 25°C)

## 产品概述

SteadyPure Mag 组织 & 细胞 RNA 提取试剂盒 (磁珠法) 旨在给客户提供一种快速、简单、高质量的 RNA 制备方法, 本产品使用高结合力超顺磁性的磁珠和独特的缓冲液系统, 可从动植物组织和培养细胞等生物样品中提取得到高收量、高纯度的 RNA。使用本试剂盒提取的 Total RNA 很少含蛋白质及基因组 DNA, 可以直接用于 Northern 杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RT-PCR 等各种分子生物学实验。同时, 本产品独特的缓冲液体系及高结合力磁珠, 既可用于单管手工法提取, 又可用于高通量工作站的提取。

## 原理

SteadyPure Mag 组织 & 细胞 RNA 提取试剂盒 (磁珠法) 采用 MagPure Reagent 裂解系统裂解样本, 样品在 MagPure Reagent 中能够充分被裂解, 在加入氯仿 (或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303) 离心后, 溶液会形成上清层、中间层和有机层 (鲜红色下层, 含有蛋白质、多糖、脂肪酸、细胞碎片、DNA), RNA 分布在上清层中, 转移上清层至新的离心管。磁珠是以  $Fe_3O_4/Fe_2O_3$  为基质的超顺磁性粒子, 外部包埋能特异性结合 RNA 的基团, 在高浓度离子化试剂条件下, 加入磁珠, 磁珠可通过氢键及静电作用特异性的吸附 RNA, 而不吸附蛋白与其他杂质。吸附了 RNA 的磁珠经洗涤液洗涤去除蛋白质、盐分及其他杂质。最后用 RNase Free Water 洗脱 RNA。

## 产品特点

1. 高通量: 可进行 96 孔板高通量及自动移液工作站操作
2. 质量好: 提取得到的 RNA 收量高、纯度高

## 产品组成 \*1

MagPure Reagent	50 ml
Mag Buffer RWA*2	26 ml
Mag Buffer RWB*3	20 ml
RNase Free Water*4	10 ml
MagPure RNA Beads	1.5 ml

\*1: 组分中 MagPure Reagent 包装于 Package 3-1 中, 放置于 4°C 保存; 组分中 MagPure RNA Beads 包装于 Package 3-2, 放置于 4°C 保存。其余组分均包装于 Package 3-3 中, 室温 (15 ~ 25°C) 保存。

\*2: Mag Buffer RWA 在首次使用前, 请添加 34 ml 的 100% 乙醇, 混合均匀后在瓶子上做好标记, 室温下保存。

\*3: Mag Buffer RWB 在首次使用前, 请添加 80 ml 的 100% 乙醇, 混合均匀后在瓶子上做好标记, 室温下保存。

\*4: RNase Free Water 开启后建议保存于 -20°C。

## 保存及运输

**保存温度:** Package 3-1 4°C 避光保存  
 Package 3-2 4°C 保存  
 Package 3-3 室温 (15 ~ 25°C) 保存

**运输温度:** Package 3-1 室温运输  
 Package 3-2 室温运输  
 Package 3-3 室温运输

## ➤ 实验前准备

氯仿（或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303）、无水乙醇、1.5 ml 离心管、离心机、磁力架或高通量设备。

## ➤ 注意事项

1. 应尽量使用新鲜的实验材料，以确保提取的 RNA 不被降解。
2. 使用液氮研磨组织材料时，应随时加入液氮，以确保提取的 RNA 不被降解。
3. 实验中使用的器皿，需要注意防止 RNase 污染。
4. 实验操作过程中，请佩戴一次性手套和口罩进行所有试剂配制和实验操作，以避免 RNase 污染。
5. 按说明书要求加入正确量的无水乙醇。
6. 使用 *MagPure* RNA Beads 前必须充分振荡混匀 2 ~ 3 分钟，使其充分悬浮。
7. 本试剂盒不含 DNase I，如需使用无氯仿抽提的方法，请自备 DNase I（可选择本公司产品 Code No. AG12001）。

## ➤ 操作流程

### 氯仿抽提法

#### 动物组织、植物材料样品

1. 将小于 30 mg 的动物组织或小于 100 mg 的植物组织提取样品转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织直至研磨成粉末状。  
【注：研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮。】
2. 将适量已研磨成粉末状的样本转移至含有 1 ml *MagPure* Reagent 的 1.5 ml 离心管中，高速涡旋振荡混匀或用移液器吹打直至裂解液中无明显沉淀（溶液清亮）。  
【注：针对柔软易裂解的组织样本，可以使用匀浆器加入适量 *MagPure* Reagent 进行匀浆裂解。】
3. 将上述混合液室温静置 5 分钟，12,000 g 4°C 离心 5 分钟。
4. 小心吸取上清液，移入新的 1.5 ml 离心管中，再进行后续的 RNA 纯化步骤。

#### 贴壁培养细胞

1. 吸出培养液，细胞用 1X PBS 清洗一次。
2. 吸出 PBS 洗液，然后每  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  的培养细胞中加入 1 ml 的 *MagPure* Reagent，轻摇培养皿，确保 *MagPure* Reagent 溶液均匀分布于细胞表面。  
【注：对于贴壁牢固的培养细胞可用细胞刮勺剥离细胞；处理速度需快，立即进行后续操作。】
3. 使用移液器反复吹打使细胞脱落，然后将内含细胞的裂解液转移至离心管中，高速涡旋振荡混匀或用移液器吹打直至裂解液中无明显沉淀（溶液清亮）。  
【注：如裂解匀浆比较粘稠，可使用小号注射器抽打裂解液 5 ~ 10 次打断 DNA】
4. 室温静置 5 分钟后，再进行后续的 RNA 纯化步骤。

#### 悬浮培养细胞

1. 8,000 g 4°C 离心 2 分钟，将悬浮细胞收集至离心管中，弃上清。
2. 向  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  细胞中加入 1 ml 的 *MagPure* Reagent。立即高速涡旋振荡混匀或用移液器吹打直至裂解液中无明显沉淀（溶液清亮）。
3. 室温静置 5 分钟后，再进行后续的 RNA 纯化步骤。

### 纯化步骤

1. 向上述裂解液中加入 *MagPure* Reagent 体积量 1/5 的氯仿（或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303），剧烈颠倒混合 2 分钟，室温静置 5 分钟。
2. 12,000 g 4°C 离心 15 分钟。小心取出离心管，此时匀浆液分为三层，即：上清液（含 RNA）、中间蛋白层及下层有机相。
3. 吸取上清液转移至另一新的 1.5 ml 离心管中（切勿吸出中间蛋白层）。
4. 向上述裂解液中加入 350  $\mu$ l 无水乙醇和 30  $\mu$ l *MagPure* RNA Beads，颠倒混匀 2 分钟，以确保磁珠与 RNA 能够充分结合；室温静置 10 分钟，期间每隔 1 分钟上下颠倒混匀 10 次，始终使管内磁珠分布均匀。
5. 将离心管置于磁力架，颠倒混匀，以避免磁珠残留于管盖。静置约 2 分钟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。
6. 移去磁力架，加入 600  $\mu$ l Mag Buffer RWA，立即涡旋振荡或颠倒混匀约 30 秒以确保洗涤充分，将离心管置于磁力架，颠倒混匀，以避免磁珠残留于管盖，静置约 2 分钟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。  
**【注：请确认 Mag Buffer RWA 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。】**
7. 移去磁力架，加入 600  $\mu$ l Mag Buffer RWB，立即涡旋振荡或颠倒混匀约 30 秒以确保洗涤充分，将离心管置于磁力架，颠倒混匀，以避免磁珠残留于管盖，静置约 2 分钟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。  
**【注：请确认 Mag Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。】**
8. 重复步骤 7。
9. 用桌面离心机短暂离心，将离心管转移至磁力架上，静置约 2 分钟直至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内残留液体。  
**【注：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。】**
10. 打开管盖，室温干燥 5 ~ 10 分钟，至磁珠表面无明显液体。
11. 移去磁力架，加入 30 ~ 100  $\mu$ l RNase Free Water，涡旋 10 ~ 15 次（溶液完全涡旋振荡、磁珠分布均匀算作一次），室温静置 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。
12. 用桌面离心机短暂离心，将离心管置于磁力架上，静置约 5 分钟直至磁珠全部吸附到管壁，吸取上清到干净离心管中，此为纯化后的 RNA 溶液。请放置于 -80°C 保存。

### 无氯仿抽提法

#### 动物组织、植物材料样品

1. 将小于 20 mg 的动物组织或小于 60 mg 的植物组织提取样品转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织直至研磨成粉末状。  
**【注：研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮。】**
2. 将适量已研磨成粉末状的样本转移至含有 1ml *MagPure* Reagent 的 1.5 ml 离心管中，高速涡旋振荡混匀或用移液器吹打直至裂解液中无明显沉淀（溶液清亮）。再进行后续的 RNA 纯化步骤。  
**【注：针对柔软易裂解的组织样本，可以使用匀浆器加入适量 *MagPure* Reagent 进行匀浆裂解。】**

#### 贴壁培养细胞

1. 吸出培养液，细胞用 1X PBS 清洗一次。
2. 吸出 PBS 洗液，然后每  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  的培养细胞中加入 0.6 ml 的 *MagPure* Reagent，轻摇培养皿，确保 *MagPure* Reagent 溶液均匀分布于细胞表面。  
**【注：对于贴壁牢固的培养细胞可用细胞刮勺剥离细胞；处理速度需快，立即进行后续操作。】**
3. 使用移液器反复吹打使细胞脱落，然后将内含细胞的裂解液转移至离心管中，高速涡旋振荡混匀或用移液器吹打直至裂解液中无明显沉淀（溶液清亮）。再进行后续的 RNA 纯化步骤。  
**【注：如裂解匀浆比较粘稠，可使用小号注射器抽打裂解液 5 ~ 10 次打断 DNA】**

#### 悬浮培养细胞

1. 8,000 g 4°C 离心 2 分钟，将悬浮细胞收集至离心管中，弃上清。
2. 向  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  细胞中加入 0.6 ml 的 *MagPure* Reagent。立即高速涡旋振荡混匀或用移液器吹打直至裂解液中无明显沉淀（溶液清亮）。再进行后续的 RNA 纯化步骤。

### 纯化步骤

1. 12,000 g 4°C 离心 10 分钟，小心吸取上清液转移至另一新的1.5ml 离心管中。
2. 向上述裂解液中加入 350 μl 无水乙醇和 30 μl *MagPure* RNA Beads，颠倒混匀 2 分钟，以确保磁珠与 RNA 能够充分结合；室温静置 10 分钟，期间每隔 1 分钟上下颠倒混匀 10 次，始终使管内磁珠分布均匀。
3. 将离心管置于磁力架，颠倒混匀，以避免磁珠残留于管盖。静置约 2 分钟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 μl Mag Buffer RWA，立即涡旋振荡或颠倒混匀约 30 秒以确保洗涤充分，将离心管置于磁力架，颠倒混匀，以避免磁珠残留于管盖，静置约 2 分钟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。  
**【注：请确认 Mag Buffer RWA 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。】**
5. DNase I 消化：
  - 1) DNase I 工作液配制：取 10 μl 10X DNase I Buffer + 10 μl DNase I + 80 μl RNase Free Water 配成 100 μl 反应体系，至新的离心管中，混合均匀。
  - 2) 将 100 μl DNase I 工作液加入样品中，轻轻振荡重悬磁珠，室温静置 20 分钟，以去除 DNA。
6. 加入 500 μl Mag Buffer RWA，立即涡旋振荡或颠倒混匀约 30 秒以确保洗涤充分，将离心管置于磁力架，颠倒混匀，以避免磁珠残留于管盖，静置约 2 分钟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。  
**【注：请确认 Mag Buffer RWA 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。】**
7. 移去磁力架，加入 600 μl Mag Buffer RWB，立即涡旋振荡或颠倒混匀约 30 秒以确保洗涤充分，将离心管置于磁力架，颠倒混匀，以避免磁珠残留于管盖，静置约 2 分钟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。  
**【注：请确认 Mag Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。】**
8. 重复步骤 7。
9. 用桌面离心机短暂离心，将离心管转移至磁力架上，静置约 2 分钟直至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内残留液体。  
**【注：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。】**
9. 打开管盖，室温干燥 5 ~ 10 分钟，至磁珠表面无明显液体。
10. 移去磁力架，加入 30 ~ 100 μl RNase Free Water，涡旋 10 ~ 15 次（溶液完全涡旋振荡、磁珠分布均匀算作一次），室温静置 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。
11. 用桌面离心机短暂离心，将离心管置于磁力架上，静置约 5 分钟直至磁珠全部吸附到管壁，吸取上清到干净离心管中，此为纯化后的 RNA 溶液。请放置于 -80°C 保存。