

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

SteadyPure Mag Tissue & Cells RNA Extraction Kit (Magnetic Beads)

Code No. AG21207

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 ~ 30°C)

产品概述

本产品旨在给客户提供一种快速、简单、高质量的 RNA 制备方法，基于高结合力超顺磁性的磁珠和独特的缓冲液系统，可从动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。使用本产品提取的 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，本产品既可用于单管手工法提取，也可配合全自动核酸提取仪使用，实现核酸的高通量提取。

安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂，实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套，然后再进行实验操作。

【注意：使用后溶液需要收集在废液桶中专门处理。】

如果 *MagPure* Reagent 或 *Mag Buffer* RWA 不小心溅出，请立刻用清水冲洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

产品组成*1

<i>MagPure</i> Reagent	50 ml
<i>MagPure</i> RNA Beads*2	1.5 ml
<i>Mag Buffer</i> RWA*3	16 ml
<i>Mag Buffer</i> RWB*4	20 ml
RNase Free Water*5	20 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 ~ 30°C) 保存。

*2: *MagPure* RNA Beads 避免冻存或使其干裂，每次取用前应涡旋振荡混匀使其充分悬浮，否则可能会导致吸取磁珠的量不一致从而影响磁珠结合 RNA 的能力

*3: *Mag Buffer* RWA 在首次使用前，请添加 24 ml 的无水乙醇 (*Mag Buffer* RWA 与无水乙醇体积比为 2 : 3)，混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。

*4: *Mag Buffer* RWB 在首次使用前，请添加 80 ml 的无水乙醇 (*Mag Buffer* RWB 与无水乙醇体积比为 1 : 4)，混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。

*5: 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 ~ 30°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

1. 自备：氯仿（或本公司 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 96 深孔板、高通量设备。
2. *Mag Buffer RWA* 在首次使用前，请添加 24 ml 的无水乙醇（*Mag Buffer RWA* 与无水乙醇体积比为 2 : 3），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 的无水乙醇（*Mag Buffer RWB* 与无水乙醇体积比为 1 : 4），混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。

注意事项

1. 本产品既可用于单管手工法提取，也可配合全自动核酸提取仪使用，实现核酸的高通量提取。如果配合全自动核酸提取仪使用，可能需要根据实际情况对自动提取的程序进行调整。
2. *MagPure RNA Beads* 切勿冻存或使其干裂，否则可能会出现磁珠团聚、官能团脱落、磁珠形态发生变化等问题，影响磁珠结合 RNA 的能力。
3. 用移液器吸取上清液时，应注意不要触碰磁珠，避免磁珠的损失，从而影响 RNA 的收量。
4. 一般情况下，磁性分离 1 min 可使磁珠与 Buffer 彻底分离，但不同磁力架的磁力会有所不同，磁性分离的时间可根据实际情况进行调整，以确保磁珠完全吸附于离心管壁，与 Buffer 彻底分离。
5. 操作过程中，用移液器将上清液吸取完全后，应尽快进行后续操作，避免磁珠长时间暴露于空气中，导致磁珠干裂。
6. 磁珠开盖晾干时要避免过分干燥，否则可能会出现磁珠干裂，从而影响 RNA 的回收效率。
7. 转移洗脱液时建议保留 2~3 μ l 液体，以免吸起到磁珠影响后续实验。
8. 应尽量使用新鲜的实验材料，以确保样本中的基因组 RNA 不被降解。
9. 使用液氮研磨组织样本时，应随时加入液氮，以确保研磨过程中 RNA 不被降解。如使用组织研磨仪，应注意低温研磨及确保研磨充分。
10. 本产品说明书推荐的最适上样量能满足大部分的样本，但对于核酸含量过高或核酸含量过低的样本，可根据需要减少或增加样本起始量。
11. 操作过程中，应预防 RNase 污染，需注意以下几方面：
 - ① 使用 RNA 操作专用实验台，经常更换新手套，穿戴 RNA 专用实验服，实验过程中尽量不要说话及来回走动，操作过程中避免物品从离心管上方经过。
 - ② 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的 RNase 污染。

操作流程

样本前处理

动物组织样本裂解（液氮研磨）：

1. 将适量新鲜或 -80°C 冻存的组织样品转移至液氮预冷的研钵中，用研磨杵研磨组织样本（研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮），直至研磨成粉末状（无明显可见颗粒，研磨不充分会影响 RNA 的收量）。
2. 取 ≤ 30 mg 的上述已研磨成粉末状的组织样本转移至含有 1 ml *MagPure Reagent* 的 1.5 ml 离心管（RNase free）中，立即高速振荡混匀或用移液器反复吹打 3~5 min，直至无明显组织沉淀，样本充分裂解后，如残留未裂解的沉淀物质可通过后续离心去除。

动物组织样本裂解（研磨棒或组织研磨仪）：

1. 将 ≤ 30 mg 的新鲜或 -80°C 冻存的组织样品转移至含有 1 ml *MagPure Reagent* 的 1.5 ml 离心管（RNase free），用研磨棒或组织研磨仪研磨 3~5 min，直至无明显组织沉淀。
2. 研磨充分后，匀浆液如不足 1 ml，用 *MagPure Reagent* 补足至 1 ml，振荡混匀。样本充分裂解后，如残留未裂解的沉淀物质可通过后续离心去除。

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，再进行后续的提取步骤。

> 操作流程

贴壁培养细胞:

1. 弃尽细胞培养液, 向每 10 cm² 的贴壁细胞 (约 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^7$ 个细胞) 中加入 1 ml PBS 液冲洗细胞。
2. 吸出 PBS 洗液, 然后每 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ 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 RNA】
4. 室温静置 5 分钟后, 再进行后续的提取步骤。

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 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ 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, 再进行后续的提取步骤。

提取步骤

1. 向上述裂解液中加入 *MagPure* Reagent 体积量 1/5 的氯仿 (或本公司 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。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)。
3. 向上述上清液中加入 350 μ l 无水乙醇, 颠倒混匀, 观察溶液的粘稠度, 若溶液呈均一流动状, 可直接进行后续操作; 若溶液呈粘液状, 此时需高速涡旋混匀或用移液枪吹打混匀至均一流动状。**混合后的溶液称为裂解结合液, 获得的裂解结合液可按照“手工法提取”或“全自动核酸提取仪提取”。**

手工法提取

1. 向上述裂解结合液中加入 30 μ 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。
2. 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。
3. 移去磁力架, 加入 600 μ 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无水乙醇。】
4. 移去磁力架, 加入 600 μ 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无水乙醇。】
5. 重复步骤 4 一次。
6. 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。
7. 打开管盖, 室温干燥 5 ~ 10 分钟, 至磁珠表面无明显液体。
【注: 磁珠开盖晾干时要避免过分干燥, 否则可能会出现磁珠干裂, 从而影响 RNA 的回收效率】



操作流程

- 移去磁力架，加入 50 ~ 100 μ l RNase Free Water，涡旋 10 ~ 15 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。

【注：RNase Free Water 的添加量可根据实际需求的 RNA 浓度调整，若需求较高浓度的 RNA，可适当降低 RNase Free Water 的添加量（例：10~50 μ l）。】

- 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。

【注：转移洗脱液时建议保留 2~3 μ l 液体，以免吸取到磁珠影响后续实验。】

全自动核酸提取仪提取

- 将瓶装试剂按照下表分装至 96 深孔板（自备）对应的孔中。

位置（列）	试剂名称	加入量（ μ l）
1/7	裂解结合液 ^{*1}	800
2/8	MagPure RNA Beads ^{*2}	30
2/8	RNase Free Water	100
3/9	Mag Buffer RWA ^{*3}	600
4/10	Mag Buffer RWB ^{*3}	600
5/11	Mag Buffer RWB ^{*3}	600
6/12	RNase Free Water	50~100

*1: 裂解结合液为“提取步骤3”中的混合液，可能有絮状沉淀产生，需将溶液及沉淀全量转移至孔板中，体积约 800 μ l。

*2: 取用前应涡旋振荡混匀使其充分悬浮，否则可能会导致吸取磁珠的量不一致从而影响磁珠结合 RNA 的能力。

*3: 请确认 Mag Buffer RWA 和 Mag Buffer RWB 中已经加入了指定体积的无水乙醇。

- 参考自动提取仪的操作方法，正确放置 96 深孔板和磁棒套。
- 启动全自动核酸提取仪的程序，具体程序如下：

核酸提取仪提取核酸程序

序号	列	混匀时间	磁吸时间	等待时间	设置温度	体系（ μ l）	速度	工作内容
1	1/7	2 分钟	0	0	室温	800	中	混匀裂解
2	2/8	1 分钟	90 秒	0	室温	130	中	混匀吸磁
3	1/7	2 分钟	120 秒	0	室温	800	中	结合
4	3/9	1 分钟	90 秒	0	室温	600	中	洗涤
5	4/10	1 分钟	90 秒	0	室温	600	中	洗涤
6	5/11	1 分钟	90 秒	0	室温	600	中	洗涤
7	6/12	3 分钟	120 秒	2 分钟	室温	50~100	中	洗脱 RNA
8	5/11	1 分钟	0	0	室温	600	中	弃磁

- 结束程序后，取出 96 深孔板和磁棒套。
- 转移第 6/12 列中的 RNA 洗脱液至新的 1.5 ml 离心管中，获得的 RNA 可直接用于后续检测或放入 -80°C 中保存。