

磁珠法全血总RNA提取试剂盒说明书

【产品名称】

通用名称：磁珠法全血总RNA提取试剂盒

【包装规格】

50T/盒（货号 NG-MB0020-50T）；100T/盒（ NG-MB0020-100T）

【预期用途】

适合从新鲜血液样品中抽提 RNA。同时适用于高通量的工作站等核酸自动化提取设备。得到的 RNA 可直接用于 Northern Blot及体外翻译等下游实验。

【检测原理】

RNA 在高盐低 pH 条件下结合于硅基包被的 Magbeads 表面，经过多次清洗，去除杂蛋白等，低盐条件下洗脱，得到高纯度的 RNA。

【主要组成成分】

组分	NG-MB0020-50T	NG-MB0020-100T
磁珠悬液	1.1 mL	2×1.1 mL
ONRoI Reagent	55 mL	105 mL
Buffer RBC	45 mL	90 mL
Buffer W1A*	22 mL	44mL
Buffer W2R*	15 mL	30mL
RNase Free Water	10 mL	20mL

【自备器材和试剂】

1. 器材：核酸提取仪（我司有不同通道核酸提取仪可选，可联系）、2.2mL96 深孔板（U 底）、磁棒套、离心管、磁力架、涡旋振荡器、移液器、恒温振荡器等；
2. 试剂：无水乙醇、氯仿。

【储存条件及有效期】

本产品除 ONRoI Reagent，Buffer RBC 外，可在室温(15~25℃)保存 12 个月。因 RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。推荐分装并保存于 2~8℃，以减少污染。

【注意事项】

1. Buffer W1A/W2R 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
2. 样本避免反复冻融；
3. 磁珠严禁冷冻，磁珠悬液使用前应充分混匀；
4. 操作前需要穿戴好防护装备；若不小心将试剂溅到皮肤或眼睛上，立即用清水冲洗 5-10min；
5. 每次使用前检查裂解液是否出现沉淀，若有，可在 55℃条件下重新溶解。

【离心管手动操作步骤】

1. 样品处理及裂解：

- 1) 在 15mL 离心管中，加入 1 倍体积的血液(≤1.5mL)和 5 倍体积 Buffer RBC(试剂按标签所示稀释使用，建议现配现用)，颠倒混匀 5-10 次。
- 2) 冰上放置 10-15min，其间颠倒混匀两次。在放置过程中，血液会从雾状变成透亮的溶液。透亮的溶液就表明了红细胞已裂解。4℃，500 x g 离心 10min，小心倒弃上清液。

3) 加入血液样本 2 倍体积的 Buffer RBC(试剂按标签所示稀释使用, 建议现配现用), 短暂涡旋重悬细胞。

注: 若血液的起始用量为 1.5mL, 则需要加入 3mL Buffer RBC。

4) 于 4°C, 500 x g 离心 10min, 小心吸弃上清液。

注: 尽量吸弃残留的溶液, 残液不能超过 100µL。收集的白细胞沉淀可直接保存于-80°C。

5) 立即加入 1mL ONRoI Reagent 至白细胞沉淀中。涡旋重悬细胞。

注: 建议用移液枪吹打 5-10 次以匀浆样品, 有利于提高产量及稳定性。

6) 充分涡旋后转移样品至新的 2mL 离心管中, 室温静置 5-10min 充分裂解细胞。

7) 加入 200µL 氯仿至裂解液中。用手剧烈振荡 15s; 室温放置 3min。

注: 用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿必须按比例加入, 过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中, 导致 RNA 的纯度下降。

8) 于 4°C, 12,000 x g 离心 15min, 转移上清液至新的离心管中, 待用。

2. **结合:** 加入 20µL 磁珠悬液及 350µL 无水乙醇, 充分涡旋混匀。室温放置 5min, 期间颠倒混匀数次。

3. **磁性分离:** 将离心管放置于磁力架静置 30s, 磁珠完全吸附后, 小心吸弃液体。

4. **清洗 1:** 将离心管从磁力架取下, 加入 600µL Buffer W1A, 涡旋混匀 1min。将离心管放置于磁力架静置 30s, 磁珠完全吸附后, 小心吸弃液体。

5. **清洗 2:** 将离心管从磁力架取下, 加入 600µL Buffer W2R, 涡旋混匀 1min。将离心管放置于磁力架静置 30s, 磁珠完全吸附后, 小心吸弃液体。

6. **清洗 3:** 重复第 5 步一次。

7. **磁性分离及除醇:** 短暂离心, 将离心管放置于磁力架上静置 10s, 吸尽残液(此步骤不可省略, 过多乙醇残留会导致后续实验抑制); 将离心管放于磁力架上, 打开盖子, 室温晾干 5- 10min (干燥时间过长会导致洗脱困难)。

8. **洗脱:** 将离心管取下, 加入 100µL RNase Free Water, 涡旋混匀, 55°C恒温 1500rpm 震荡5min (亦可 55°C水浴, 期间涡旋混匀 3~4 次)。

9. **核酸转移:** 将离心管放于磁力架上, 静置吸磁 2min, 转移 RNA 溶液至新的离心管保存于- 80°C。

【机提-16/32 通道核酸提取仪操作步骤】

1. 样品处理及裂解

参照【离心管手动操作步骤】操作。

2. **上样准备:**在 96 孔板中分别参照下表用量加入每个相应孔位, 可同步完成 16/32 个样品的处理。

孔列位	1/7	2/8	3/9	4/10	6/12
试剂	磁珠悬液 (20µL) + 无水 乙醇 (350µL)	Buffer W1A (600µL)	Buffer W2R (600µL)	BufferW2R (600µL)	RNase Free Water (100µL)

3. 上机提取

将上述处理好上清液 400-500µL 转移至含无水乙醇和磁珠板位或孔位中 (即 32 通道提取仪为孔位 1/7 列), 然后将准备好的 96 孔样品板按顺序放入核酸提取仪中, 并插入磁棒套, 打开仪器的操作程序, 选中相应程序, 点击运行, 开始提取。

4. 核酸转移

仪器运行结束后, 将 96 孔板的第 6/12 列孔位的洗脱液转移至干净的无核酸酶的离心管中。

32 通道核酸提取仪程序各参数设置如下:

步骤编号	孔位	名称	等待时间(min)	混合时间(min)	吸磁时间(sec)	容积(μL)	混合速度	温度(°C)
1	1	裂解结合	0	5	60	1000	2	OFF
2	2	清洗 1	0	2	60	600	3	OFF
3	3	清洗 2	0	1	60	600	3	OFF
4	4	清洗 3	0	1	60	600	3	OFF
5	6	洗脱	2	5	60	100	3	60
6	4	弃磁珠	0	1	0	600	2	OFF

【机提—96 通道核酸提取仪操作步骤】

1. 样品处理及裂解

参照【离心管手动操作步骤】操作。

2. 上样准备:在各 96 孔板中分别参照下表用量加入每个相应板位,可同步完成 96 个样品的处理。

板位	1	2	3	4	6
试剂	磁珠悬液 (20μL) + 无水乙醇 (350μL)	Buffer W1A (600μL)	Buffer W2R (600μL)	Buffer W2R (600μL)	RNase Free Water (100μL)

3. 上机提取

将上述处理好上清液转移至工位 1 的 96 深孔板内,然后将准备好的 96 孔样品板按顺序放入核酸提取仪中,并插入磁棒套,打开仪器的操作程序,选中相应程序,点击运行,开始提取。

4. 核酸转移

仪器运行结束后,将第 6 工位的洗脱液直接封膜或转移至干净的无核酸酶的离心管中,于-20°C保存备用。

96 通道核酸提取仪器程序各参数设置如下:

步骤	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步
工位	1	2	3	4	6	4
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:02:00	00:00:00
混合模式	2	3	3	3	3	2
混合时间	00:05:00	00:02:00	00:01:00	00:01:00	00:05:00	00:00:30
是否暂停	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:00:00
体积	1000μL	600μL	600μL	600μL	100μL	600μL
温度	—	—	—	—	60°C	—