AFTMag Quick Tissue/Cell RNA Extraction Kit for Animal

产品目录号：RK30155

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1 20 RXN	规格-2 100 RXN	保存条件
Mag Buffer RLA	RM30286	11 mL	55 mL	RT
Mag Buffer BD	RM30287	10 mL	45 mL	RT
Mag Buffer WA1	RM30288	20 mL	90 mL	RT
Mag Buffer WA2	RM30289	20 mL	90 mL	RT
Mag Buffer WA3	RM30338	20 mL	90 mL	RT
Mag Beads A	RM30292	220 µL	1.1 mL	RT
DNase I, RNase-free (5,000 U/mL)	RM21312	80 µL	2 × 220 µL	-20℃
DNase I Buffer	RM30588	2 × 1.25 mL	12 mL	4℃
RNase-free Water	RM30295	4 mL	20 mL	RT

产品说明

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。

适用样本

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，以及新鲜和冻存的动物组织的总 RNA 提取。

保存温度

DNase I, RNase-free (5,000 U/mL）：-20℃保存；

DNase I Buffer：4℃保存；

其他试剂：常温（10-30℃）保存和运输。

注意事项

1. 本试剂盒提取 RNA 实验中应全程避免 RNase 污染：
   (1)注意勤换新手套，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℃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，增加浓度，但是洗脱体积低于 30 µL 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 尽量使用液氮处理超低温保存的样品。
3. 提取大于 5×10^6 个细胞量细胞 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至深孔板对应孔位中进行结合反应。后续提取不受影响。
4. 提取心脏、肌肉等蛋白含量较高的组织、脂肪和脑组织以及微量细胞样本时，需自备 Proteinase K (ABclonal, RP02503LQ）。
5. 提取血液样本时，需自备红细胞裂解液、Proteinase K (ABclonal, RP02503LQ)和 DNase I , RNase-free (5,000 U/mL) (ABclonal, RK20549)。

E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126

For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.

产品性能指标

1. 293F 细胞样本提取平均得率如下表所示：

细胞用量（个）	1000	2000	5000	1×10^4	1×10^5	1×10^6	2×10^6	5×10^6	1×10^7
RNA 得率（μg）	0.1	0.16	0.27	0.64	5	30	45	112	183

小鼠不同组织提取样本得率如下表所示：

组织类型	心	肝	脾	肺	肾	脑	脂肪	肌肉	睾丸	尾巴	皮肤
RNA 得率（μg/10 mg 组织）	2-8	60-90	70-120	20-35	35-50	5-12	5-12	2-5	20-30	2-5	5-10

2. 提取纯度：A260/A280 的值在 1.8 以上；A260/A230 的值一般在 1.7 以上，提取微量细胞（10^3-10^4 个细胞）时，A260/A230 的值在 1.0 以上。
3. 提取核酸完整度：琼脂糖凝胶电泳图上，RNA 28S 和 18S 条带清晰，无明显拖尾，且 28S/18S 亮度比>2，或者毛细管电泳 RQN 值大于 8。

操作说明

实验准备

根据样品数量，配制相应体积的 DNase I 反应混合液（每个反应配制用量如表 1 所示），分装到相应工位的 96 孔板中或者放到冰上/4℃冰箱待用（手工提取）。DNase I 反应混合液尽量现配现用，避免酶活性降低。

表 1. DNase I 反应混合液配制体系

组分	单个反应用量		
	提取细胞/组织*	提取血液（1 mL）**	提取血液（1.5 mL）**
DNase I, RNase-free (5,000 U/mL)	4 μL	10 μL	12 μL
DNase I Buffer	96 μL	90 μL	88 μL

***注：DNase I 使用前请短暂离心，将管壁上的液体离心至管底。当提取数量≤105 的细胞或者 DNA 含量较低的组织时，可以将 DNase I 使用量减少到 2-3 μL，DNase I Buffer 使用量相应调整为 98 μL-97 μL。**

****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, RNase-free (5,000 U/mL) (ABclonal, RK20549）。**

样本裂解和匀浆

1. 悬浮细胞

取适量新鲜细胞悬浮液（细胞数量建议不超过 10^7 个）至 1.5 mL 离心管，4℃，600 × g 离心 5 min，弃尽上清后加入推荐用量裂解液 **Mag Buffer RLA**（用量参照表 2），反复吹打重悬裂解细胞或涡旋裂解细胞至匀浆澄清透明。

2. 贴壁细胞

单层贴壁细胞弃尽培养基上清，使用 1X 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。

(1)细胞数量≤10^7：可加推荐量裂解液 **Mag Buffer RLA**（用量参照表 2）反复吹打使细胞脱落并裂解。

(2)细胞数量>10^7：需要胰酶消化后用 PBS 重悬，取一定数量细胞的悬浮液，按照悬浮细胞处理方法裂解即可。

(3)96 孔板培养贴壁细胞：弃净培养基或者 PBS 洗液上清后，加入 110 μL/孔现配的裂解混合液（按照每孔 100 μL **Mag Buffer RLA**+10 μL **Proteinase K（20 mg/mL）**配制*，现用现配，配好的裂解混合液需要在 30 分钟内加入细胞中），反复吹打使细胞脱落并裂解。

***注：Proteinase K（20 mg/mL）按照样本数来添加，一个样本加 10 μL，与 Mag Buffer RLA 的用量无关。**

表 2. 不同细胞投入量裂解液推荐用量

细胞用量	Mag Buffer RLA
≤10^5	300 μL
10^5-10^7	500 μL
96 孔板培养贴壁细胞	100 μL

E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126

For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.

3. Trizol 保存细胞

新鲜培养细胞，一般 10^5-10^7 细胞沉淀加 1 mL Trizol，混匀后立即冻存于-80℃待用。使用时，取 500 μL Trizol 保存的细胞匀浆，补充裂解液 **Mag Buffer RLA** 200 μL 后充分混匀，加入 300 μL 结合液 **Mag Buffer BD** 中进行后续提取。

注：常规预分装试剂结合液 Mag Buffer BD 为 400 μL，需吸弃 100 μL，保留 300 μL 使用。

4. 动物组织（5-30 mg）

表 3. 不同组织投入量推荐用量

组织部位	肝	脾	肺	肾	心	脑	肌肉
推荐用量	≤20 mg	≤20 mg	≤30 mg	≤30 mg	10-40 mg	5-40 mg	10-40 mg

注：若初次提取某种 RNA 丰度无参考范围的组织，推荐样品量从 10 mg 开始测试。

(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；或称 10-20 mg 左右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）至组织呈粉状。

注：确认组织被充分研磨成粉末，若仍有少量块状组织，可适当增加研磨次数，每次研磨都需重新用液氮预冷金属模块（保证多次短时间研磨可避免样本升温降解）。

b.加入 500 μL 裂解液 **Mag Buffer RLA**（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需在裂解后加入 0.2 mg 蛋白酶 K/样本，即每个样本加入 10 μL **Proteinase K（20 mg/mL）**，充分混匀后静置 2-3 min）。4℃，16,000 × g 离心 5 min，取上清进行后续提取。

(2)湿磨组织

称 10-20 mg 左右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 **Mag Buffer RLA** 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裂解后加入 0.2 mg 蛋白酶 K/样本，即每个样本加入 10 μL **Proteinase K（20 mg/mL），**充分混匀后静置 2-3 min）。4℃，16,000 × 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按照正常组织进行干磨或湿磨处理即可。

5. 冷冻切片组织（≤10 片，切片厚度 4-20 μm）

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 **Mag Buffer RLA**，迅速涡旋振荡或用移液器吹打混匀至无明显絮状沉淀，4℃，16,000 × g，离心 5 min，取上清进行后续提取。

注：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。

6. 新鲜血液

(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℃，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℃，450 × g 离心 10 min，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 **Mag Buffer RLA**，涡旋混匀后加入 60 μL **Proteinase K（20 mg/mL）**，涡旋混匀 30 s-1 min 至无明显细胞团块即可。

E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126
For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.

自动提取

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 5、6）。
2. （预分装试剂省略此步）非预分装试剂请预先将各组分（使用前务必充分摇匀）按照下表进行分装并做好标记。

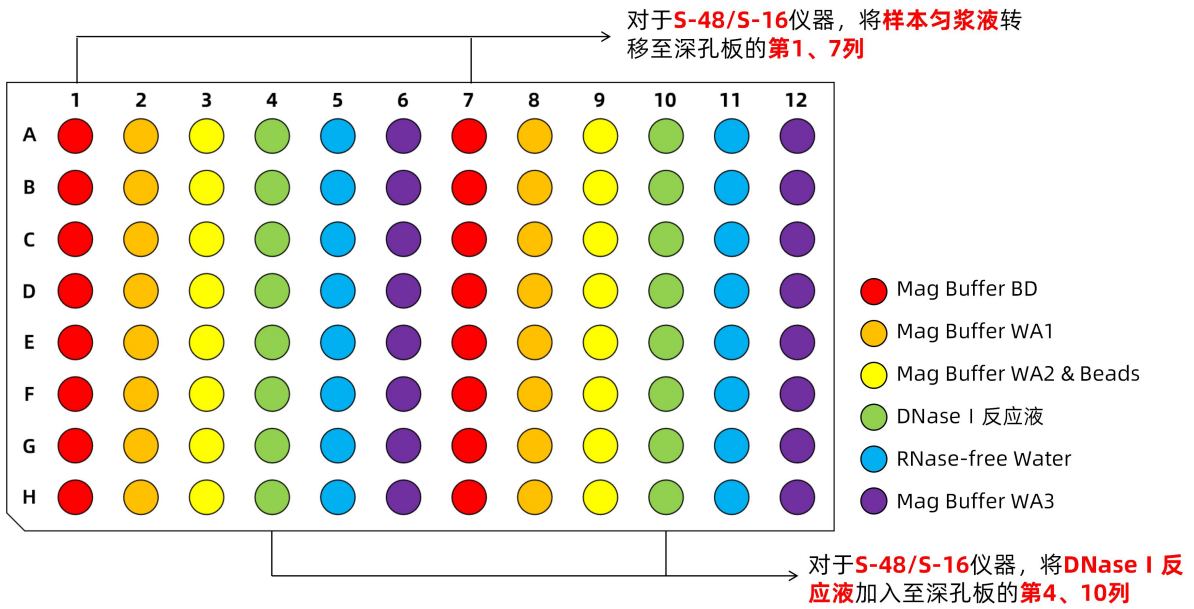
表 4. 不同试剂分装量及对应布板位/工位

组分	试剂分装量	16 RXN-布板	96 RXN-工位
Mag Buffer BD	400 μL/孔	1/7 列	工位 1
Mag Buffer WA1	800 μL/孔	2/8 列	工位 2
Mag Buffer WA2 + Mag Beads A	800 μL+10 μL/孔	3/9 列	工位 3
DNase I 反应液	100 μL/孔	4/10 列	工位 4
Mag Buffer WA3	800 μL/孔	6/12 列	工位 5
RNase-free Water	30-100 μL/孔*	5/11 列	工位 6

注：洗脱液 RNase-free Water 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（避免孔板振动，液体溅出），将配制好的 **DNase I 反应混合液**加入至 **16 RXN-布板的第 4/10 列（S-16/S-48 提取仪）**或 **96 RXN-工位 4 对应的 96 孔板（N-96 提取仪）**中。
4. 按样本裂解和匀浆方案对样本进行处理并将**样本匀浆**转移至 **16 RXN-布板的第 1/7 列（S-16/S-48 提取仪）**或 **96 RXN-工位 1 对应的 96 孔板中（N-96 提取仪）**。
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，**16 RXN-布板的第 5/11 列孔（S-16/S-48 提取仪）**或 **96 RXN-工位 6 的 96 孔板（N-96 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℃短期保存，-80℃长期保存。

试剂分装布板示意图



E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126

For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.

手动提取

1. 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。
2. 加入 400 μL **Mag Buffer BD**，颠倒混匀 6-8 次，再加入 10 μL **Mag Beads A**（使用前务必混匀），涡旋振荡混匀 5 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 Mag Buffer BD 混匀后会有絮状沉淀产生，属于正常现象。
3. 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，吸弃管中液体。
4. 将离心管从磁力架取出，加入 800 μL **Mag Buffer WA1**，涡旋振荡混匀 2 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，吸弃管中液体。
5. 将离心管从磁力架取出，加入 800 μL **Mag Buffer WA2**，涡旋振荡混匀 2 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，吸弃管中液体，开盖晾干 2 min。
6. 向离心管中加入 100 μL 配制好的 **DNase I 反应混合液**，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）。消化结束后，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，吸弃管中液体。
7. 将离心管从磁力架取出，加入 800 μL **Mag Buffer WA3**，涡旋振荡混匀 2 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，吸弃管中液体。
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 **RNase-free Water** 将离心管壁的磁珠冲洗至管底，60℃加热振荡混匀 5 minn（或加热 5 min，同时每分钟轻弹 EP 管壁使磁珠保持分散，以达到最佳洗脱状态）。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℃短期保存，-80℃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。

E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126
For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.

各型号仪器提取程序

表 5. S-16/S-48 全自动核酸提取仪细胞/组织/血液 RNA 提取参考程序

步骤	一	二	三	四	五	六	七	八
工位	3	1	2	3	4	6	5	3
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:15	00:00:00	00:04:00	00:00:00
混合模式	M1	M1 **(M2)**[a]	M2 **(M3)**[a]	M2 **(M3)**[a]	M1	M2 **(M3)**[a]	M1	M1
混合时间	00:00:00	00:05:00 **(00:10:00)**[a]	00:02:00	00:02:00	00:15:00	00:02:00	00:05:00	00:00:10
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:00:00
体积	810 μL	900 μL **(950 μL)**[a]	800 μL	810 μL	100 μL	800 μL	100 μL[c]	810 μL
温度[b]	--	25℃	--	--	--	--	60℃ **(70℃)**[a]	--

注：a. 括号中加粗字体为提取血液样本对应参数；

b. S-16/S-48 卡槽中，对应 96 孔板工位 1 和 5 有加热模块，用户可按需将加热的步骤置于可加热工位上；

c. 仪器洗脱参数设置按照实际洗脱体积设定，实际洗脱体积应不低于 30 μL。

表 6. N-96 全自动核酸提取仪细胞/组织/血液 RNA 提取参考程序

步骤	一	二	三	四	五	六	七	八
工位	3	1	2	3	4	5	6	3
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:15	00:00:00	00:04:00	00:00:00
混合模式	M1	M1 **(M2)**[a]	M2 **(M3)**[a]	M2 **(M3)**[a]	M1	M2 **(M3)**[a]	M1	M1
混合时间	00:00:00	00:05:00 **(00:10:00)**[a]	00:02:00	00:02:00	00:15:00	00:02:00	00:05:00	00:00:10
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:00:00
体积	810 μL	900 μL **(950 μL)**[a]	800 μL	810 μL	100 μL	800 μL	100 μL[c]	810 μL
温度[b]	--	25℃	--	--	--	--	60℃ **(70℃)**[a]	--

注：a. 括号中加粗字体为提取血液样本对应参数；

b. N-96 卡槽中，对应工位 1 和 6 有加热模块，用户可按需将加热的步骤置于可加热工位上；

c. 仪器洗脱参数设置按照实际洗脱体积设定，实际洗脱体积应不低于 30 μL。

E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126

For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.