

## 产品组分

| 组分名称                             | 组分编号    | 规格-1        | 规格-2    | 保存条件  |
|----------------------------------|---------|-------------|---------|-------|
|                                  |         | 20 RXN      | 100 RXN |       |
| Mag Buffer RLC                   | RM30306 | 15 mL       | 70 mL   | RT    |
| Mag Buffer BDA                   | RM30307 | 9 mL        | 45 mL   | RT    |
| Mag Buffer WD1                   | RM30308 | 15 mL       | 75 mL   | RT    |
| Mag Buffer WD2 & Beads           | RM30309 | 15 mL       | 75 mL   | RT    |
| Mag Buffer WD2                   | RM30310 | 15 mL       | 75 mL   | RT    |
| Mag Buffer EA                    | RM30311 | 4 mL        | 20 mL   | RT    |
| DNase I, RNase-free (5,000 U/mL) | RM21312 | 40 µL       | 220 µL  | -20°C |
| DNase I Buffer                   | RM30294 | 2 × 1.25 mL | 12.5 mL | 4°C   |

## 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、芯片分析、二代测序建库、Northern Blot 和分子克隆等下游实验。

## 储存条件

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

DNase I Buffer: 4°C保存；

其他试剂：常温（10-30°C）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。建议使用高质量的 RNase-free 耗材，注意勤换新手套，避免皮肤表面的 RNase 导致样品 RNA 的降解。
2. 装有磁珠的 96 孔板或试剂瓶使用前一定要充分摇匀。
3. 若提取过程中需要用到其他玻璃器皿，可在 150°C 烘烤 4-6 h。
4. 使用前检查试剂的密封状态是否完好，如低温下试剂有沉淀析出，请将试剂在 65°C 烘箱放置 30 min 左右，混匀澄清后使用。注意，放进烘箱的试剂请保持密封状态，预分装试剂不要撕开铝膜。
5. 磁珠需充分晾干，否则会影响 A260 与 A230 的比值。
6. 提取 RNA 请尽量使用新鲜样本，冻存样本应避免反复冻融。

## 样本类型

| 样本类型  | 适用植物种类                              |
|-------|-------------------------------------|
| 根、茎、叶 | 水稻、小麦、玉米、拟南芥、大豆、马铃薯、烟草、番茄、芝麻、黄瓜、绿萝等 |
| 种子    | 大豆、绿豆                               |
| 果肉    | 番茄、柑橘                               |
| 果皮    | 柠檬                                  |
| 真菌    | 平菇、香菇、蘑菇、金针菇                        |

## 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下表所示，一般会配制（样品数量+1）管的总量），分装到相应工位的深孔板中或者放到冰上/4℃冰箱待用（手工提取）。DNase I 反应混合液现配现用，避免酶活性丧失。

表 1. DNase I 反应混合液配制体系

| 组分                               | 每个反应用量     |
|----------------------------------|------------|
| DNase I, RNase-free (5,000 U/mL) | 2 $\mu$ L  |
| DNase I Buffer                   | 98 $\mu$ L |

### 样本裂解

- 幼嫩植物根、茎、叶及黄化苗样本适用液氮研磨和湿磨。
- 植物种子样本、较老的根、茎、叶适用液氮研钵研磨和液氮自动研磨（大量组织、硬组织、含水量高组织）。种子较小可以适用液氮自动研磨（小量组织）。
- 植物果肉、果皮适用液氮研钵研磨和液氮自动研磨（大量组织、硬组织、含水量高组织）。
- 真菌类样本如平菇、香菇和金针菇适用液氮研钵研磨和液氮自动研磨（大量组织、硬组织、含水量高组织）。

注：若样本较为复杂（如果实样本、较老的叶片样本），或初次提取效果不佳，可在裂解时加入 **CY Reagent (RM30325)** 15-20  $\mu$ L。

#### 1. 液氮研磨裂解

##### (1) 研磨

- 研钵**：将植物样本处理成小块放入研钵，并全程在液氮浸泡条件下，使用研磨杵用力将植物组织研磨至细粉状。
- 研磨棒**：将植物样本处理成小块放入 1.5 mL 离心管中，然后浸泡在液氮中。使用液氮预冷的研磨棒旋转研磨样本，直到植物样本呈细粉状。
- 自动研磨（小量组织）**：将植物样本放入含 3 颗 3 mm 钢珠的 2 mL 离心管中，盖紧盖子放入液氮中冷冻 30 s，同时将研磨仪的适配器放入液氮冷冻 30 s。使用研磨仪 60 Hz，30 s 研磨 3 次，每次研磨暂停后液氮冷冻 30 s 再继续研磨。
- 自动研磨（大量组织、硬组织、含水量高组织）**：使用 15/30/50 mL 规格的钢罐与适配的研磨仪进行。先将钢罐放在液氮中预冷，然后将植物样本放进钢罐中，拧紧钢罐再次液氮冷冻 30 s 后放入研磨仪，60 Hz，30 s 研磨 3 次，每次研磨暂停后液氮冷冻 30 s 再继续研磨。

注：研磨完后迅速转移至液氮预冷的保存管中，需要长期保存放置于-80℃冰箱中，立即开展提取实验则放置在液氮中。

##### (2) 裂解

- 准备无酶的 1.5 mL 离心管，液氮预冷后分装研磨好的粉末，并依据表 2 推荐加入 **Mag Buffer RLC**。涡旋振荡 3 min，室温静置裂解 10 min。
- 15,000 rpm，4℃离心 5-10 min。离心后，将离心管取出放置在冰上，待准备好提取试剂后，取上清 500  $\mu$ L 转移至 **16 RXN-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（S-96/N-96 提取仪）** 上机提取或离心管手动提取。

表 2. 不同样本投入量裂解液推荐用量

| 样本量 (mg)    | Mag Buffer RLC ( $\mu$ L) |
|-------------|---------------------------|
| 25-100      | 550                       |
| 100-200     | 700                       |
| 200-300     | 1000                      |
| *种子 10-25   | 1000                      |
| *果肉 100-300 | 550                       |

#### 2. 湿磨裂解（仅新鲜样本）

- 将植物样本放入含 3 颗 4-5 mm 钢珠的 2 mL 离心管中，依据表 2 推荐加入 **Mag Buffer RLC**。使用研磨仪 70 Hz 运行 5 min。
- 15,000 rpm，4℃离心 5-10 min。离心后，将离心管取出放置在冰上，待准备好提取试剂后，取上清 500  $\mu$ L 转移至 **16 RXN-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（S-96/N-96 提取仪）** 上机提取或离心管手动提取。

第 1/7 列 (S-16/S-48 提取仪) 或 96 RXN-工位 1 对应的 96 孔板中 (S-96/N-96 提取仪) 上机提取或离心管手动提取。

### 3. 直接裂解 (植物原生质体)

100 g soft 模式离心 2 min 后小心弃掉细胞上清, 加入 400  $\mu$ L **Mag Buffer RLC**, 振荡混匀 1-2 min, 室温静置裂解 5-10 min。无需离心, 将裂解产物全部用于提取。

#### 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 4-6)。
2. 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 6/12 列 (S-16/S-48 提取仪)** 或 **96 RXN-工位 4 对应的 96 孔板 (S-96/N-96 提取仪)** 中, 每孔 100  $\mu$ L。
3. 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 3. 不同试剂分装量及对应布板位/工位

| 组分名称                   | 试剂分装量          | 96 RXN-工位 | 16 RXN-布板 |
|------------------------|----------------|-----------|-----------|
| Mag Buffer BDA         | 400 $\mu$ L    | 工位 1      | 第 1/7 列   |
| Mag Buffer WD1         | 700 $\mu$ L    | 工位 2      | 第 2/8 列   |
| Mag Buffer WD2 & Beads | 700 $\mu$ L    | 工位 3      | 第 3/9 列   |
| DNase I 反应混合液          | 100 $\mu$ L    | 工位 4      | 第 6/12 列  |
| Mag Buffer WD2         | 700 $\mu$ L    | 工位 5      | 第 4/10 列  |
| Mag Buffer EA          | 50-100 $\mu$ L | 工位 6      | 第 5/11 列  |

4. 取 500  $\mu$ L 离心后的样本上清转移至 **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 (S-96/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 (S-96/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,  $-20^{\circ}\text{C}$  短期保存,  $-80^{\circ}\text{C}$  长期保存。

#### 手动提取

1. 将 **Mag Buffer WD2 & Beads** 充分振荡混匀, 按提取样品数量准备 1.5 mL RNase-free 离心管, 每管吸取 700  $\mu$ L **Mag Buffer WD2 & Beads**。置于磁力架上吸磁 30 s, 将上清转移至 RNase-free 离心管中待用 (上清即为 **Mag Buffer WD2**), 磁珠保留待用。
2. 充分摇匀 **Mag Buffer BDA** 后, 吸取 400  $\mu$ L **Mag Buffer BDA** 转移至上一步装有磁珠的离心管中。
3. 吸取 500  $\mu$ L 离心后的样本上清 (若离心后的上清液较多, 可最多吸取 1000  $\mu$ L 的上清液) 转移至上一步装有 **Mag Buffer BDA** 与磁珠的离心管中。振荡混匀 5 min, 置于磁力架上吸磁 30 s, 弃掉全部上清。

注: 如有絮状沉淀产生属于正常现象, 振荡混匀即可。

4. 从磁力架上取出离心管, 加入 700  $\mu$ L **Mag Buffer WD1**。振荡混匀 2 min, 置于磁力架上吸磁 30 s, 弃掉全部上清。
5. 向离心管加入步骤 1 中收集的 700  $\mu$ L **Mag Buffer WD2**。振荡混匀 2 min, 置于磁力架上吸磁 30 s, 弃掉全部上清。
6. 开盖晾干 15 s, 加入 100  $\mu$ L **DNase I 反应混合液**, 室温低速振荡混匀 15 min。置于磁力架上吸磁 30 s, 弃掉全部上清。
7. 从磁力架上取出离心管, 加入 700  $\mu$ L **Mag Buffer WD2**。振荡混匀 2 min, 置于磁力架上吸磁 30 s, 弃掉全部上清。
8. 开盖晾干 2 min, 此时可将洗脱液 **Mag Buffer EA** 于  $55^{\circ}\text{C}$  预热。待磁珠晾干后加入 50-100  $\mu$ L **Mag Buffer EA**, 在  $55^{\circ}\text{C}$  旋转金属浴上加热溶解 3.5 min。置于磁力架上吸磁 1 min, 转移全部液体至新的 RNase-free 离心管中, 注意不要吸到磁珠,  $-20^{\circ}\text{C}$  短暂保存,  $-80^{\circ}\text{C}$  长期保存。

## 各型号仪器提取程序

表 4. S-96 全自动核酸提取仪参考程序

| 步骤          | 一      | 二     | 三         | 四     | 五      | 六           | 七      | 八      |
|-------------|--------|-------|-----------|-------|--------|-------------|--------|--------|
| 工位          | 3      | 1     | 2         | 3     | 4      | 5           | 6      | 5      |
| 等待时间        | 0:0:0  | 0:0:0 | 0:0:0     | 0:0:0 | 0:0:15 | 0:0:0       | 0:2:0  | 0:0:0  |
| 混合时间        | 0:0:10 | 0:5:0 | 0:2:0     | 0:2:0 | 0:15:0 | 0:2:0       | 0:3:30 | 0:0:20 |
| 混合速度        | 6      | 1     | 6         | 6     | 1      | 6           | 2      | 6      |
| 是否暂停        | 否      | 否     | 否         | 否     | 否      | 否           | 否      | 否      |
| 吸磁时间        | 0:50   | 1:0   | 0:30      | 0:30  | 0:55   | 0:30        | 1:0    | 0:0    |
| 裂解温度℃: 25.0 |        |       | 洗脱温度℃: 65 |       |        | 4 °C保存: 0:0 |        |        |

表 5. N-96 全自动核酸提取仪参考程序

| 步骤   | 一        | 二        | 三        | 四        | 五        | 六        | 七        | 八        |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 工位   | 3        | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        | 5        |
| 等待时间 | 00:00:00 | 00:00:00 | 00:00:00 | 00:00:00 | 00:00:15 | 00:00:00 | 00:02:00 | 00:00:00 |
| 混合模式 | 6        | 1        | 6        | 6        | 1        | 6        | 2        | 6        |
| 混合时间 | 00:00:10 | 00:05:00 | 00:02:00 | 00:02:00 | 00:15:00 | 00:02:00 | 00:03:30 | 00:00:20 |
| 是否暂停 | 否        | 否        | 否        | 否        | 否        | 否        | 否        | 否        |
| 吸磁时间 | 00:00:50 | 00:01:00 | 00:00:30 | 00:00:30 | 00:00:55 | 00:00:30 | 00:01:00 | 00:00:00 |
| 体积   | 700 μL   | 900 μL   | 700 μL   | 700 μL   | 100 μL   | 700 μL   | 100 μL   | 700 μL   |
| 温度   | --       | 25℃      | --       | --       | --       | --       | 65℃      | --       |

表 6. S-16/S-48 全自动核酸提取仪参考程序

| 步骤   | 一        | 二        | 三        | 四        | 五        | 六        | 七        | 八        |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 工位   | 3        | 1        | 2        | 3        | 6        | 4        | 5        | 4        |
| 等待时间 | 00:00:00 | 00:00:00 | 00:00:00 | 00:00:00 | 00:00:15 | 00:00:00 | 00:02:00 | 00:00:00 |
| 混合模式 | 3        | 1        | 3        | 3        | 1        | 3        | 2        | 3        |
| 混合时间 | 00:00:10 | 00:05:00 | 00:02:00 | 00:02:00 | 00:15:00 | 00:02:00 | 00:03:30 | 00:00:20 |
| 是否暂停 | 否        | 否        | 否        | 否        | 否        | 否        | 否        | 否        |
| 吸磁时间 | 00:00:50 | 00:01:00 | 00:00:30 | 00:00:30 | 00:00:55 | 00:00:30 | 00:01:00 | 00:00:00 |
| 体积   | 700 μL   | 900 μL   | 700 μL   | 700 μL   | 100 μL   | 700 μL   | 100 μL   | 700 μL   |
| 温度   | --       | 25℃      | --       | --       | --       | --       | 65℃      | --       |