

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 RLM	RM30478	15 mL	70 mL	RT
Mag Buffer BDH	RM30479	10 mL	50 mL	RT
Mag Buffer WM1	RM30480	15 mL	75 mL	RT
Mag Buffer WM2 & Beads	RM30481	15 mL	75 mL	RT
Mag Buffer WM2	RM30482	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
CY Reagent	RM30325	400 µL	2 × 1 mL	-20°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;

CY Reagent: -20°C保存;

其他试剂: 常温 (10-30°C) 保存和运输。

注意事项

1. 操作本试剂盒提取植物 RNA 全流程中需要避免一切 RNase 的污染，包括但不限于来自使用的乳胶手套、移液吸头、样本研磨的离心管与研钵等耗材。因此要避免使用劣质手套，在操作中需要勤换手套，戴好口罩，避免提取环境中有多人往来及与他人交谈。
2. 建议使用高质量的 RNase-free 耗材，如无可靠的耗材，可自行使用 0.2% DEPC 水进行过夜处理耗材，处理过的耗材在 65°C 烘箱干燥过夜即可完全去除残留的 DEPC。
3. 植物提取的高质量 RNA 在测定分光光度计时，其 A260/A280 比值在 1.8-2.2 之间，A260/A230 比值在 1.8-2.2 之间。若出现 A260/A280 的比值异常，则暗示有蛋白质的残留，结合琼脂糖凝胶电泳检测可进一步排除是否有蛋白残留，如琼脂糖凝胶电泳显示有较为明显的点样孔发亮和条带弥散拖尾，则表明有蛋白的残留。

样本类型

样本类型	适用植物种类
根、茎、叶	棉花、红薯、香蕉、芝麻、油菜、番茄、绿茶、山茶、咖啡、菠菜、青菜、香菜、辣椒、枸杞、大葱、西兰花、苜蓿等；也可兼容部分普通植物样本如：水稻、小麦、玉米、土豆、烟草、大豆、拟南芥
种子	水稻、玉米、小麦、拟南芥、油菜、花生、大豆、绿豆、咖啡
果肉	苹果、番茄、柑橘、黄瓜、红薯、青豆、荷兰豆
果皮	柠檬、柑橘
真菌	金耳、银耳

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 μ L
DNase I Buffer	98 μ 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）。
- 真菌类样本如金耳、银耳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）。

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 RLM** 和 15-20 μ L **CY Reagent**。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 μ L 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）** 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 RLM (μ L)
25-100	600
100-200	700
200-300	1000
*种子 10-25	1000
*果肉 100-300	600-1000

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 RLM** 和 15-20 μ L **CY Reagent**。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 μ L 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）** 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 μL **Mag Buffer RLM** 和 15 μL **CY Reagent**，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 μL 。
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 BDH	450 μL	工位 1	第 1/7 列
Mag Buffer WM1	700 μL	工位 2	第 2/8 列
Mag Buffer WM2 & Beads	700 μL	工位 3	第 3/9 列
DNase I 反应混合液	100 μL	工位 4	第 6/12 列
Mag Buffer WM2	700 μL	工位 5	第 4/10 列
Mag Buffer EA	50-100 μL	工位 6	第 5/11 列

4. 取 500 μL 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°C 短期保存， -80°C 长期保存。

手动提取

1. 将 **Mag Buffer WM2 & Beads** 充分振荡混匀，取 700 μL 到 1.5 mL 离心管中，将离心管置于磁力架上，静置 30 s，将上清全部转移到新的 1.5 mL 离心管中待用（上清即为 **Mag Buffer WM2**），磁珠保留待用。
2. 充分摇匀 **Mag Buffer BDH** 后，吸取 450 μL **Mag Buffer BDH** 转移至上一步装有磁珠的离心管中。
3. 吸取 500 μL 离心后的样本上清（若离心后的上清液较多，可最多吸取 1000 μL 的上清液）转移至上一步装有 **Mag Buffer BDH** 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 μL **Mag Buffer WM1**。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 μL **Mag Buffer WM2**。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 μL **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 μL **Mag Buffer WM2**。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°C 预热。待磁珠晾干后加入 50-100 μL **Mag Buffer EA**，在 55°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°C 短暂保存， -80°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	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步	第 7 步	第 8 步
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
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℃保存: 0:0		

表 5. N-96 全自动核酸提取仪参考程序

步骤	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步	第 7 步	第 8 步
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	950 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	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步	第 7 步	第 8 步
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	950 μL	700 μL	700 μL	100 μL	700 μL	100 μL	700 μL
温度	--	25℃	--	--	--	--	65℃	--