

产品组分

● 适用于 S-16/S-48 自动核酸提取仪

组分名称	组分编号	规格
		16 RXN
Mag Buffer RLK	RM30572	11 mL
AFTMag Quick Tissue/Cell RNA Extraction Reagents for Animal V2 (Prepackaged)	RM30573	16 RXN
Mag Beads H	RM30578	440 μ L
RNase-free Water	RM30295	2 mL
DNase I	RM30293	60 μ L
DNase I Buffer	RM30588	2 mL
Proteinase K	RM30513	400 μ L
8-Well Mag-rod Sleeve	RM30277	2 pk

注: 预分装 96 孔板中已分装 70 μ L 洗脱液 RNase-free Water, 另单独配一管 2 mL 洗脱液 RNase-free Water 备用。

● 适用于 N-96 自动核酸提取仪

组分名称	组分编号	规格
		96 RXN
Mag Buffer RLK	RM30572	55 mL
Mag Buffer BDJ	RM30574	96 RXN
Mag Buffer WQ1	RM30575	96 RXN
Mag Buffer WQ2	RM30576	96 RXN
Mag Buffer WQ3	RM30577	96 RXN
Mag Beads H	RM30578	2.2 mL
RNase-free Water	RM30295	96 RXN
RNase-free Water	RM30295	4 mL
DNase I	RM30293	320 μ L
DNase I Buffer	RM30588	12 mL
Proteinase K	RM30513	2 $\times$ 1.2 mL
96-Well Mag-rod Sleeve	RM30283	1 pk
96 Deep-Well Plate, U-Bottom, Square Well, 2.2 mL	RM30278	1 pk

注: 预分装 96 孔板中已分装 70 μ L 洗脱液 RNase-free Water, 另单独配一管 4 mL 洗脱液 RNase-free Water 备用。

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: -20°C 保存; DNase I Buffer、Proteinase K: 4°C 保存; 其他试剂: 常温 (10 - 30°C) 保存。

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°C 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. 如提取微量细胞或者 RNA 含量较低组织样本，建议将洗脱液减少到 30-50 μL ，提取组织量较大时，建议适当增加洗脱液。
5. 为避免蒸发等因素对预分装试剂的影响，建议收到预分装试剂后保存在阴凉（温度低于 30°C，非阳光直射）环境中，并尽快使用。

操作说明

实验准备

根据样品数量，配制相应体积的 DNase I 反应液（单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°C 冰箱待用（手工提取）。DNase I 反应液尽量现配现用，避免酶活性降低。

表 1. DNase I 反应液配制体系

组分	每个反应用量
DNase I	3 μL
DNase I Buffer	97 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 $\leq 10^5$ 的细胞或者 DNA 含量较低的组织时，可以将 DNase I 使用量减少至 2 μL ，DNase I Buffer 使用量相应调整为 98 μL 。

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°C，600 $\times$ g 离心 5 min，弃尽上清后加入推荐用量裂解液 **Mag Buffer RLK**（用量参照表 2），反复吹打来重悬裂解细胞或涡旋裂解细胞至匀浆澄清透明。

注：提取微量细胞 RNA 时，建议加入 10 μL Proteinase K。

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 $\leq 10^7$ ：可加推荐量裂解液 **Mag Buffer RLK**（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 RLK**+10 μL **Proteinase K** 配制，现用现配，配好的裂解混合液需要在 30 分钟内加入到细胞中），反复吹打使细胞脱落并裂解。

表 2. 不同细胞投入量裂解液推荐用量

细胞用量	Mag Buffer RLK
$\leq 2 \times 10^5$	300 μL
$\leq 10^7$	500 μL
96 孔板培养贴壁细胞	100 μL

3. 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 μ L 裂解液 **Mag Buffer RLK**、20 μ L **Proteinase K**，立即振荡混匀 2 min 至管内无明显块状/絮状组织颗粒，静置 5-10 min。4 $^{\circ}$ C，16,000 $\times$ g 离心 5 min，取上清进行后续提取。

注：加入裂解液 **Mag Buffer RLK** 时，温度过低液体会冻住，可摇晃离心管使其迅速融化。

(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 μ L 裂解液 **Mag Buffer RLK**、20 μ L **Proteinase K** 和 3 颗 5 mm 钢珠，60 Hz 研磨 30 s，静置 5-10 min。4 $^{\circ}$ C，16,000 $\times$ 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，使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。

4. 冷冻切片组织 (≤10 片，切片厚度 4-20 μ m)

取冷冻组织切片至液氮预冷的离心管中，立即加入 500 μ L 裂解液 **Mag Buffer RLK**，迅速涡旋振荡或用移液器吹打混匀至无明显絮状沉淀，4 $^{\circ}$ C，16,000 $\times$ 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 μ m，切片数为 2 片，再根据 RNA 提取得率进行调整。

5. Trizol 保存细胞/组织匀浆

(1) Trizol 保存细胞/组织匀浆直接提取：将深孔板中 **Mag Buffer BD** 弃掉，换成 400 μ L 50% 异丙醇，取 500 μ L Trizol 保存的细胞/组织匀浆加入到至 **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 (N-96 提取仪)**，按照表 7 程序进行后续提取。

(2) Trizol 保存细胞/组织匀浆经过氯仿抽提后的上清提取：将深孔板中 **Mag Buffer BD** 弃掉，换成 200 μ L 95%-100% 异丙醇，取经氯仿抽提后的上清 500-550 μ L 加入到 **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)**，按照表 8 程序进行后续提取。

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 5-8）。
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

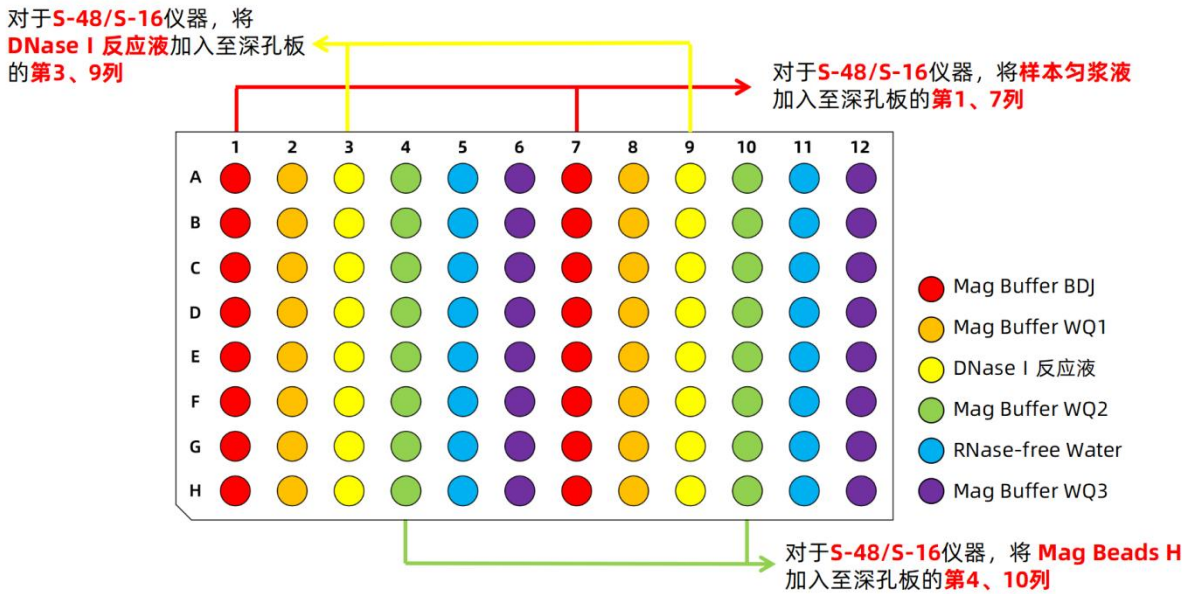
组分	试剂分装量	16 RXN-布板	96 RXN-工位
Mag Buffer BDJ	400 μ L/孔	1/7 列	工位 1
Mag Buffer WQ1	700 μ L/孔	2/8 列	工位 2
DNase I 反应液	100 μ L/孔	3/9 列	工位 3
Mag Buffer WQ2 + Mag Beads H	800 μ L + 20 μ L/孔	4/10 列	工位 4
Mag Buffer WQ3	800 μ L/孔	6/12 列	工位 5
RNase-free Water	30-100 μ L/孔	5/11 列	工位 6

注：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 μ L，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 $\times$ rpm 离心 1 min）。小心撕去封口膜（避免孔板振

- 动, 液体溅出), 向 **Mag Buffer WQ2** 对应的孔位中 (**S-16/S-48 提取仪: 第 4/10 列; N-96 提取仪: 工位 4**) 加入 20 μL **Mag Beads H**。将配制好的 **DNase I 反应液** 加入至 **16 RXN-布板** 的第 3/9 列 (**S-16/S-48 提取仪**) 或 **96 RXN-工位 3** 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**样本匀浆液**转移至 **Mag Buffer BDJ** 对应的孔位中 (**S-16/S-48 提取仪: 第 1/7 列; N-96 提取仪: 工位 1**)。
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°C 短期保存, -80°C 长期保存。

试剂分装布板示意图



自动提取程序

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

步骤	一	二	三	四	五	六	七	八
工位	4	1	2	3	4	6	5	4
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:15	00:00:00	00:00:00	00:03:00	00:00:00
混合模式	1	1	2	1	2	2	1	3
混合时间	00:00:00	00:05:00	00:02:00	00:15:00	00:02:00	00:02:00	00:05:00	00:00:30
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:01:00	00:00:30	00:00:30	00:01:00	00:00:00
体积	820 μL	900 μL	700 μL	100 μL	820 μL	800 μL	70 μL^b	820 μL
温度 ^a	--	25 $^{\circ}\text{C}$	--	--	--	--	60 $^{\circ}\text{C}$	--

注: a. 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;

b. 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 RNA 提取参考程序

步骤	一	二	三	四	五	六	七	八
工位	4	1	2	3	4	5	6	4
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:15	00:00:00	00:00:00	00:03:00	00:00:00
混合模式	1	1	2	1	2	2	1	3
混合时间	00:00:00	00:05:00	00:02:00	00:15:00	00:02:00	00:02:00	00:05:00	00:00:30
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:01:00	00:00:30	00:00:30	00:01:00	00:00:00
体积	820 μ L	900 μ L	700 μ L	100 μ L	820 μ L	800 μ L	70 μ L ^b	820 μ L
温度 ^a	--	25°C	--	--	--	--	60°C	--

注：a. 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的工位上；

b. 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 μ L。

表 7. 兼容 Trizol 保存细胞/组织匀浆进行总 RNA 提取参考程序

步骤	一	二	三	四	五	六	七	八	九
工位	4	1	2	3	2	4	6/5 ^a	5/6 ^b	4
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:15	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:03:00	00:00:00
混合模式	1	1	2	1	2	2	2	1	3
混合时间	00:00:00	00:05:00	00:02:00	00:15:00	00:02:00	00:02:00	00:02:00	00:05:00	00:00:30
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:01:00	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:01:00	00:00:00
体积	820 μ L	900 μ L	700 μ L	100 μ L	700 μ L	820 μ L	800 μ L	70 μ L ^c	820 μ L
温度 ^d	--	25°C	--	--	--	--	--	60°C	--

注：a. 第 7 步洗涤步骤，S-48 和 S-16 设备上在工位 6，N-96 设备上在工位 5；

b. 第 8 步中洗脱步骤，S-48 和 S-16 设备上在工位 5，N-96 设备上在工位 6；

c. 仪器洗脱参数按照实际洗脱体积设定，实际洗脱体积应不低于 30 μ L；

d. 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的工位上。

表 8. 兼容 Trizol 保存细胞/组织匀浆-氯仿抽提上清进行总 RNA 提取参考程序

步骤	一	二	三	四	五	六	七
工位	4	1	2	4	6/5 ^a	5/6 ^b	4
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:03:00	00:00:00
混合模式	1	1	2	2	2	1	3
混合时间	00:00:00	00:05:00	00:02:00	00:02:00	00:02:00	00:05:00	00:00:30
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:01:00	00:00:00
体积	820 μ L	750 μ L	700 μ L	820 μ L	800 μ L	70 μ L ^c	820 μ L
温度 ^d	--	25°C	--	--	--	60 °C	--

注：a. 第 5 步洗涤步骤，S-48 和 S-16 设备上在工位 6，N-96 设备上在工位 5；

b. 第 6 步中洗脱步骤，S-48 和 S-16 设备上在工位 5，N-96 设备上在工位 6；

c. 仪器洗脱参数按照实际洗脱体积设定，实际洗脱体积应不低于 30 μ L；

d. 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的工位上。