



Magbead Tissue RNA Kit(DNase I)

磁珠法组织RNA提取试剂盒(DNase I)

Cat. No. CW3711S

产品简介

本试剂盒提供了一种简单、高效的动物组织RNA自动化提取方案。动物组织经物理方法破碎后，裂解产物中的RNA在高盐存在时结合于硅基包被的磁珠表面，经漂洗液漂洗去除蛋白质等杂质，然后加入DNase I去除DNA，最后RNA经过漂洗后洗脱于RNase-Free Water中。提取过程中无需使用 β -巯基乙醇和酚/氯仿等有毒有害试剂，即可提取得到高质量的RNA。提取的RNA可用于RT-PCR、Real-Time PCR、芯片分析、体外翻译等多种下游实验。

储存条件： DNase I及10×Reaction Buffer -20°C保存，其它组分室温(15-30°C)。

产品内容

Component	CW3711S
	96 preps
DNase I	2×1000 U
10×Reaction Buffer	2×1000 μ L
Buffer PL1	50 mL
Buffer PL2	15 mL
Buffer RW1	50 mL
Buffer RW2(concentrate)	33 mL
RNase-Free Water	8 mL
Magbeads PN	5 mL

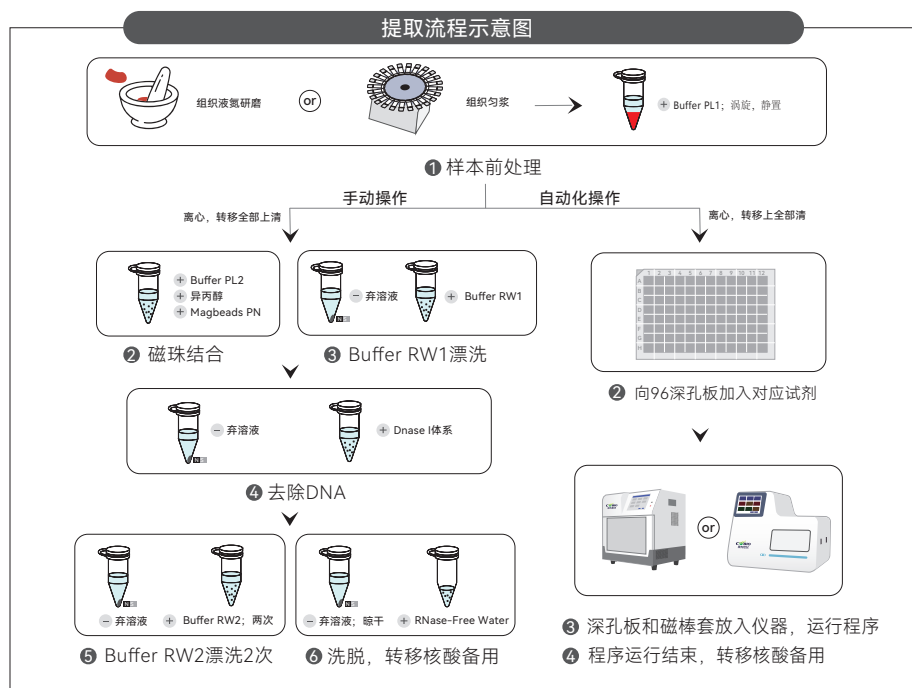
自备仪器、试剂

1. 康为世纪CWE960、离心管、离心机、RNase-Free枪头、研钵或匀浆仪。
2. Isopropanol(异丙醇)。

实验前准备及重要注意事项

1. 预防RNase污染, 应注意以下几方面:
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头, 避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180°C高温下干烤4小时, 塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10分钟, 用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 操作人员戴一次性口罩和手套, 实验过程中要勤换手套。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer RW2 (concentrate)中加入无水乙醇。
3. 样品处理量请介于15-25 mg组织;对于肝脏、脾脏、肾脏等组织, 因其DNA与RNA含量丰富, 请勿投入超过20 mg, 否则会导致提取存在gDNA残留或者RNA产量降低。
4. 提取的样品避免反复冻融, 否则影响RNA提取的产量和质量。当使用提取新鲜样本时, 若不能及时提取, 可将样本立即置于液氮中速冻, 后置于一85~-65°C保存, 并避免反复冻融;为了 避免RNA的降解, 应该尽快进行样本的采集与保存。
5. 应尽快将裂解液Buffer PL1加到样本中, 勿等样本完全化冻后加入, 防止提取过程中产生RNA降解。
6. 研磨或者匀浆来破碎样本应彻底;匀浆时尽量控制温度, 防止温度过高导致RNA降解。
7. 所有的离心步骤若无特殊说明均在4°C下进行, 且所有操作步骤动作要迅速。
8. 将提取仪开启紫外消毒30 min, 提前配置所需样本数量的Dnase I体系(80 μ L Dnase I体系配置: 取52 μ L RNase-Free Water向其中加入8 μ L 10 \times Reaction Buffer和20 μ L DNase I (1U/ μ L), 混匀, 配置成终体积为80 μ L的反应液), 配置好后放在冰上储存。

操作步骤



手动操作

1. 向研磨好的组织内加入500 μL Buffer PL1, 涡旋5 s, 充分重悬(涡旋时间不宜过长)静置5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm离心4 min, 取全部上清置于1.5 mL离心管(自备)中。
2. 向离心管(自备)中加入120 μL PL2、300 μL 异丙醇、50 μL Magbeads PN, 充分重悬涡旋5 s后将离心管放于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1000 rpm 的恒温混匀仪上震荡混匀6分钟或将离心管连续颠倒混匀6分钟。(震荡过程中确保Magbeads PN 处于混匀状态)。之后将离心管放于磁力架上静置1分钟, 待Magbeads完全吸附于离心管侧壁后轻轻颠倒磁力架将离心管盖上的杂质洗落后彻底弃去溶液(保持离心管固定于磁力架上)。
3. 向离心管(自备)中加入500 μL RW1, 充分重悬涡旋5s后将离心管放于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1200 rpm 的恒温混匀仪上震荡混匀1分钟或将离心管连续颠倒混匀1分钟。(震荡过程中确保Magbeads PN 处于混匀状态)。之后将离心管放于磁力架上静置1分钟, 待Magbeads PN 完全吸附于离心管侧壁后轻轻颠倒磁力架将离心管盖上的杂质洗落后彻底弃去溶液(保持离心管固定于磁力架上)。
4. 向离心管(自备)中直接加入80 μL DNase I 反应液, 充分重悬涡旋5 s后20-30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育8分钟。
5. 向离心管(自备)中加入700 μL RW2(确认已加入乙醇), 充分重悬涡旋5s后将离心管放于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1200 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀1分钟或将离心管连续颠倒混匀1分钟。(震荡过程中确保 Magbeads PN 处于混匀状态)。之后将离心管放于磁力架上静置1分钟, 待Magbeads PN 完全吸附于离心管侧壁后轻轻颠倒磁力架将离心管盖上的杂质洗落后彻底弃去溶液(保持离心管固定于磁力架上)。
6. 重复步骤5。
7. 将离心管盖子打开置于室温3分钟以彻底晾干。
注意: 这一步目的是将离心管中残余乙醇去除, 乙醇残留会影响后续酶促反应(酶切、PCR等)。
8. 向离心管(自备)加入50-70 μL RNase-Free Water, 充分重悬涡旋 5 s 后将离心管放于65 $^{\circ}\text{C}$ 、1000 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀6分钟或将离心管连续颠倒混匀6分钟。(震荡过程中确保 Magbeads PN 处于混匀状态)。之后将离心管放于磁力架上静置1分钟, 待Magbeads PN 完全吸附于离心管侧壁后轻轻转移液体至新离心管(自备)。
9. -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存RNA。

自动化操作 (与CWE960匹配)

1. 向研磨好的组织内加入500 μL Buffer PL1, 涡旋5 s, 充分重悬(涡旋时间不宜过长)静置5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm离心4 min, 取全部上清, 转移至Plate 1中。
2. 依次按照下表在96深孔板中分装试剂

Position	Reagent
Plate 1	Lysate+120 μL Buffer PL2+300 μL Isopropanol
Plate 2	500 μL Buffer RW1
Plate 3	80 μL Dnase I 体系
Plate 4	700 μL Buffer RW2+50 μL Magbeads PN
Plate 5	700 μL Buffer RW2
Plate 6	70 μL RNase-Free Water

3. 将磁棒套放置于Plate4中, 约34分钟后程序运行结束。程序运行结束后, 取出96深孔板, 将Plate 6中的洗脱液转移至新离心管中, -80℃保存。

提取程序

孔位	释放磁珠	名称	等待时间	混合时间	混合速度	循环数	磁吸时间	体系	温度
4	装磁棒套								
4	收集磁珠 5 s/次, 1次								
1	是	混合	0	4 min	慢	1	5 s/次, 2次	900 μL	室温
				3 min	慢				
2	是	混合	0	1 min	慢	1	5 s/次, 1次	500 μL	室温
3	是	混合	0	2 min	慢	1	5 s/次, 2次	80 μL	室温
				3 min	慢				
4	是	混合	0	1 min	慢	1	5 s/次, 1次	700 μL	室温
5	是	混合	0	1 min	慢	1	5 s/次, 1次	700 μL	室温
5	是	干燥	2 min	0				700 μL	室温
6	是	洗脱	0	6 min	慢	1	5 s/次, 1次	70 μL	65℃
4	卸磁棒套								