
Auto-Mag® RNA纯化回收试剂（磁珠法）

(Auto-Mag® RNA-Pure)

使用说明书 (V-2.1)

产品目录号： S008-01, S008-02, S008-03, S008-04

目录

免责声明和安全信息	1
产品介绍	2
试剂盒组成成分和包装规格	2
保存方法及注意事项	2
试剂准备	2
附加信息	3
Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂（磁珠法）操作程序	4
总 RNA 纯化回收操作步骤	4
RNA 分选和纯化操作步骤	6
常见问题回答	7

免责声明和安全信息

该试剂盒仅限研究使用。不可用于诊断目的。所有生物样本都具有潜在传染性。使用试剂盒时请务必穿着合适的实验外套，一次性手套和护目镜。如需了解更多信息，请查阅相应的材料安全数据表 (MSDS)。

产品介绍

Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂（磁珠法）是基于固相磁珠技术，专为在各种酶促反应（如体外转录、DNase I 处理、加帽和标记）以及其他 RNA 提取方法（如苯酚/氯仿提取）后进行 RNA 的清理和浓缩而设计。通过使用补充方案，该试剂还可用于基于 NGS 的流程中，从总 RNA 样本中选择性回收不同大小范围的 RNA。

Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂（磁珠法）既适用于手动操作，也可以与自动化液体处理系统相结合，用于高通量样品清理。获得的高度纯化 RNA 可直接用于下游应用，包括 PCR 和 RT-PCR 反应、RNase 保护测定、RNAi 实验的转染、反义 RNA (aRNA) 扩增、微阵列探针制备、cDNA 合成和标记以及 RNA-Seq 文库制备等。

产品特点

- 适用于 RNA 和 cDNA
- 无需离心步骤，无需过滤步骤
- 快速可靠地纯化总 RNA，包括 miRNA、siRNA 和 aRNA
- 彻底去除盐、未结合的引物和 dNTP
- 高效进行 RNA 分选，
- 兼容手动和自动处理
- 该试剂盒使用步骤和 Beckman RNAClean XP 或同类产品高度一致，可直接替换。

试剂盒组成成分和包装规格

产品目录号	S008-01	S008-02	S008-03	S008-04
Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂（磁珠法）	5 ml	50 ml	250 ml	500 ml

保存方法及注意事项

Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂（磁珠法）是常温运输，收到后可储存在 2-8°C，有效期 12 个月。不要冷冻。

准备试剂

1. 准确配制 80% 乙醇（由无水乙醇制备，请勿使用工业乙醇）

注意：因为一般量筒精度偏差较大，不建议使用量筒配制。可采用称重方法配制。如配制好 100 毫升 80% 乙醇：称重 63.2 克（80 毫升）100% 无水乙醇，加入 20 克（20 毫升）去离子水。总重 83.2 克。即为 100 毫升 80% 乙醇。乙醇有吸湿性，随着时间的推移，乙醇会蒸发并吸收水分。80% 乙醇需新鲜配制，盖紧，一周内使用。

2. 无 RNA 酶洗脱缓冲液或去离子水。(Tris (10 mM, pH 8.0) or TE (10 mM Tris, pH 8.1 mM EDTA))

附加信息

1. 无RNA酶污染工作环境

RNA 的纯度和完整性对于下游应用至关重要。RNA 可被 RNase A 降解, RNase A 是一种在任何实验室环境中都存在的高稳定性污染物。应遵循一些预防措施, 以避免引入污染性核酸酶, 尤其是在清洗和洗脱步骤中。RNase 污染的最常见来源是手、灰尘颗粒、受污染的实验室设备、溶液和玻璃器皿。处理 RNA 时, 应遵循以下程序以限制 RNase 污染:

- 工作时务必戴手套并经常更换手套。
- 避免使用其他一般实验室流程中常用的试剂、耗材和设备。
- 使用专用的无 RNase 设备, 如移液器、移液器吸头、凝胶盒等。
- 如果可用, 请在单独的房间、通风橱或实验室空间中工作。
- 使用经认证不含 RNase 的塑料一次性耗材。
- 购买经认证不含 RNase 的试剂, 如常用缓冲液和水。制备小份单独的缓冲液, 以避免反复转出储备缓冲液。这降低了储备溶液中污染的风险。
- 开始工作前, 用商用 RNase 抑制表面活性剂溶液或 70% 乙醇擦拭工作表面。
- 提取后和操作时将 RNA 放在冰上。
- 将提取的 RNA 储存在 -20°C 下。为了长期稳定, 将 RNA 保存在 -80°C 下。

2. 无需磁分离装置手动操作,

使用Auto-Mag® RNA纯化回收试剂(磁珠法)操作时, 各步骤需要兼容的磁分离装置来沉淀磁性颗粒。如果不使用磁分离装置的情况下的手动操作纯化, 可以采用离心方法使磁性颗粒形成沉淀和液体分离。可以将样品管或 96 孔板离心 30秒(单管: 全速; 96 孔板: $3,000 \times g$ 。所有过程均在室温 ($15\sim 25^{\circ}\text{C}$) 下进行。

Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂（磁珠法）操作程序

用户自备材料和设备

- 采用单管形式纯化：无核酸酶 1.5~2.0 ml 管和磁分离架。
- 采用 96 孔板格式：96 孔 PCR 反应板，或容量为 300 微升圆底微量滴定板，或 1.2 ml 深孔微量滴定板和适当的磁分离装置。
- 96 孔板封板膜
- 实验室混合器、涡流器或类似设备
- 80% 乙醇（由无水乙醇制备。请勿使用工业酒精
- 100% 异丙醇
- 洗脱缓冲液或去离子水
- 校准良好的移液器和一次性移液器吸头。

操作前准备工作

- 配制 80% 乙醇。
- 使用前将 Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂（磁珠法）放置于室温平衡至少 30 分钟。
- 涡旋振荡悬浮液 Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂。

总 RNA 纯化回收操作步骤

该操作程序适用于 1.5 ml 小试管或 96 孔板。从预先提取的总 RNA 或酶反应中纯化和回收所有 RNA 分子，包括 miRNA、siRNA 和 aRNA。

1. 将 Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂的磁珠完全悬浮以保证磁珠混匀。
2. 确定 RNA 样品体积，将待纯化样品加到 1.5 毫升小离心管，或 96 孔板中。

注意：PCR 板一般最大容量为 200 μ l，若 RNA 样本体积乘以 5 超过 200 μ l，请将样本转移至 500 μ l 圆形板或 1.2ml 深孔板中。

3. 参考表 1，向样品中加入适量的 Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂。

表 1

样品体积（微升）	Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂（微升）*	100% 异丙醇（微升）**
10	18	20
25	45	50
50	90	100
100	180	200

*每次反应所需的 Auto-Mag® RNA 纯化回收试剂的量 = 1.8 X 样品体积

**每次反应所需的 100% 异丙醇的量 = 2 X 样品体积

4. 涡旋混匀 10 秒，或移液器吹打 10 次混匀。。

注意：如果使用 96 孔板和涡旋混匀，则在涡旋之前必须使用 96 孔板封板膜封板。

5. 室温放置 5 分钟。

注意：对于>50微升的样品，建议延长孵育时间。对于单链cDNA的纯化，孵育时间最长为20分钟可以提高回收率。

6. 将 1.5 毫升小离心管 或 96 孔板放置于适当的磁分离装置上静置 5 分钟，或待溶液完全澄清后。

7. 小心吸弃所有的液体。吸取液体时请勿触及管壁上的磁性颗粒。

8. 保持样品在磁分离装置上，加入 200 微升新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，不必悬浮磁珠，室温温育 10 秒，吸弃所有的液体。吸取液体时请勿触及管壁上的磁性颗粒。

注意：若样本加试剂总体积超过200ul，则每次洗涤所用80%乙醇的量至少应为原始RNA样本量的5倍。例如：100ul RNA样本需 $100 \times 5 = 500$ ul 80%乙醇进行洗涤。

9. 重复步骤 8 一次。

10. 保持样品在磁分离装置上，室温下开盖 5分钟以晾干磁珠。

注意：完全除去所有的液体是非常重要的。必要时用移液器除去残余液体。

11. 取下磁分离装置上的 1.5 毫升小离心管或样品板，加入 20~50 微升去离子水。涡旋混匀 20 秒，或移液器吹打 20 次重新悬浮的磁性颗粒。

12. 室温放置 5 分钟。

13. 将 1.5 毫升小离心管 或 96 孔板重新放置于适当的磁分离装置上静置 2~5 分钟，或待溶液完全澄清。

14. 用移液器转移上清液到新的 1.5 毫升小离心管，或 96 孔板。纯化回收的 RNA可放置-80C 储存 或用于后续的实验。

RNA分选和纯化操作步骤

下列方案适用于从 50 μ l 总 RNA 样本中分离和回收“大 RNA, > 200nt”和“小 RNA, <200nt”。

1. 将 Auto-Mag[®] RNA纯化回收试剂的磁珠完全悬浮以保证磁珠混匀。
2. 将 50 微升提取的RNA样品加到 1.5 毫升小离心管, 或 96 孔板中。如果样品不足50 微升, 用去离子水补足至50 微升。
3. 将加有样品的离心管或96孔板标记为“**大RNA样品**”。加入50 微升Auto-Mag[®] RNA纯化回收试剂。
4. 涡旋混匀 10 秒, 或移液器吹打 10 次混匀。室温放置 10 分钟。
注意: 如果使用 96 孔板和涡旋混匀, 则在涡旋之前必须使用 96 孔板封板膜封板。
5. 将 “**大RNA样品**” 放置于适当的磁分离装置上静置 5 分钟, 或待溶液完全澄清后。
6. 保持“**大RNA样品**”在磁分离装置上, 小心吸取所有的上清液 (约 100 微升)。转移到新的 1.5 毫升小离心管, 或 96 孔板中。并标记为 “**小RNA样品**”
注意: 吸取液体时请勿触及或携带出管壁上的磁珠颗粒。
7. 如需回收大RNA, 跳到步骤12, 继续完成大RNA的洗涤和解离回收步骤。如不需要回收大RNA。丢弃“**大RNA样品**”。
8. 将 Auto-Mag[®] RNA纯化回收试剂的磁珠再次完全悬浮以保证磁珠混匀。
9. 将 40 微升Auto-Mag[®] RNA纯化回收试剂, 和 50微升 100% 异丙醇加入到含有上清液的“**小 RNA样品**”的1.5 毫升小离心管, 或 96 孔板中板孔中。涡旋混匀 10 秒, 或移液器吹打 10 次混匀
注意: 如果使用 96 孔板和涡旋混匀, 则在涡旋之前必须使用 96 孔板封板膜封板。
10. 将“**小RNA 样品**”室温放置 10分钟。
11. 将“**小RNA 样品**”放置于适当的磁分离装置上静置 5 分钟, 或待溶液完全澄清后, 小心吸弃所有的液体。吸取液体时请勿触及管壁上的磁性颗粒。
12. 保持样品在磁分离装置上, 加入 200 微升新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠, 不必悬浮磁珠, 室温温育 10 秒, 吸弃所有的液体。吸取液体时请勿触及管壁上的磁性颗粒。
13. 重复步骤 12 一次。
14. 保持样品在磁分离装置上, 室温下开盖 5分钟以晾干磁珠。
注意: 完全除去所有的液体是非常重要的。必要时用移液器除去残余液体。
15. 取下磁分离装置上的 1.5 毫升小离心管或样品板, 加入 20~50 微升去离子水。涡旋混匀 20 秒, 或移液器吹打 20 次重新悬浮的磁性颗粒。
16. 室温放置 5 分钟。
注意: 将洗脱缓冲液预热至 55[°]C 可以增加回收量。
17. 将 1.5 毫升小离心管 或 96 孔板重新放置于适当的磁分离装置上静置 2~5 分钟, 或待溶液完全澄清。
18. 用移液器转移上清液到新的 1.5 毫升小离心管, 或 96孔板。纯化回收的 RNA分选产物可放置 -80[°]C 储存, 或用于后续的实验。

常见问题回答

请参考下列列表解决纯化过程所碰到的问题。如需进一步帮助，请通过电话联系技术支持。若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽能力为您排忧解难。

现象	产生原因	建议方法
纯化回收率低	试剂添加量不正确	检查操作步骤以确保缓冲液配制、缓冲液和乙醇以及洗脱液的添加顺序正确
	磁珠丢失	如果在去除上清液的过程中磁珠被吸到吸头中，与这些磁珠结合的核酸也会丢失。缓慢吸出并尽可能多地去除上清液，而不干扰磁珠。
	试剂混合不充分	在磁珠结合混合和洗脱混合过程中需充分混合。以确保磁珠充分重悬。
	反应体积过大	大体积反应可以延长的结合和分离间。将结合时间增加至 10 分钟，并确保在去除上清液之前磁珠已充分靠壁。
	洗脱体积过低	洗脱体积小会导致回收率降低。增加洗脱体积。
RNA降解	RNA酶污染	为了避免 RNA 纯化过程中出现 RNase 污染，请确保在干净的实验台上操作，戴上手套并使用一次性无 RNase 移液器吸头和微量离心管。不使用时，请将所有试剂盒组件密封。
	RNA保存方法不对	纯化的 RNA 应储存于 -80°C。
干扰后续应用	乙醇残留	确保在最后的洗涤步骤后除去所有乙醇。在室温下干燥磁珠 5~10 分钟。
	DNA残留	某些应用可能需要去除 DNA。将提取的 RNA 样本用 DNase I 处理。