



技术手册

MagneSil 总 RNA 小量提取系统

该操作手册适用于：Z3351



www.promega.com.cn

Part # CTB328



MagneSil Total RNA mini-Isolation System

这份说明书的英文原文可以从以下网址下载<http://www.promega.com>.请登陆以上网页查看您是否使用的是最新版的说明书。如果您在使用这个系统时有任何问题,请与Promega 技术支持联系。邮件: chinatech@promega.com.cn

MagneSil Total RNA mini-Isolation System	1
I 说明	2
II 产品构成	3
III 使用须知	3
III.A. 一步法纯化 RNA.....	3
III.B.样品容量	4
III.C.创建无 RNA 酶的环境.....	4
IV. 开始抽提之前	4
IV.A. 溶液的准备	4
IV.B. 样品的制备	5
V. Biomek® 2000 Laboratory Workstation 的全自动 RNA 纯化	5
V.A. 仪器配制	6
V.B.Biomek®2000 平台的初始布局	6
VI. 使用 Biomek®FX Laboratory Workstation 自动化纯化 RNA	7
VI.A. 仪器配制	8
VI.B. Biomek®FX 的初始设置.....	8
VII. MagneSil®Total RNA mini-Isolation System 操作手册的介绍	10
VII.A. 样品制备	10
VII.B. 操作手册	10
VII.C. 使用 MagneSil®Total RNA mini-Isolation System 于 384-well 模式	11
VIII. 可选机械化平台使用指南	12
IX.疑难解答	12
X.应用文献	13
XI.相关产品	14

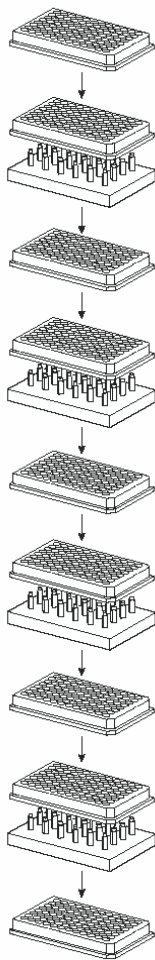
I 说明

MagneSil® Total RNA mini-Isolation System^(a) 从小量的细胞 ($\leq 1 \times 10^5$ 组织培养细胞), 组织 ($\leq 2\text{mg}$ 组织, 加 $100\mu\text{l}$ 的裂解液) 或者新鲜的全血 ($\leq 20\mu\text{l}$) 中快速, 简便的纯化完整的总 RNA, 是一种适用于 96 孔板的高通量纯化方法。也可以用排枪和平皿振荡器手动纯化, 或者用多个液体处理工作站进行高通量自动纯化。此外在 384 孔板中, 从细胞 ($\leq 1 \times 10^3$ 个) 和新鲜分离的全血 ($\leq 5\mu\text{l}$) 纯化总 RNA 也是可行的。本试剂盒在总 RNA 的纯化过程中不需要经过真空过滤, 离心和沉淀。96 孔板的总 RNA 的纯化方法只需 30 分钟。

MagneSil® Total RNA mini-Isolation System^(a) 采用 MagneSil® RNA 顺磁性磁珠技术。样品裂解之后, 核酸能被 MagneSil® RNA 磁珠捕获到。洗涤磁珠, 并在含 DNA 酶溶液中孵育以除去污染的基因组 DNA。然后 DNA 酶进行失活处理, 洗涤去除降解的基因组 DNA, 纯化的总 RNA 用无核酸酶的水洗脱 (图 1)。试剂盒提供了从 96 或者 384 孔板中抽提总 RNA 的充足的试剂。为获得最佳实验结果, 所有材料在使用时都必须经过彻底的检测, 保证没有核糖核酸酶污染。

此操作手册专用于 MagneSil® Total RNA mini-Isolation System 进行自动或者手动纯化总 RNA。也对 Beckman Coulter Biomek® 2000 和 Biomek® FX 实验室工作站提供特殊操作手册。了解工作站全自动方法的详细信息请登陆: www.promega.com/automethods/

用 MagneSil® Total RNA mini-Isolation System 纯化全 RNA 适用于各种分子生物学包括终点 RT-PCR 扩增和实时定量 RT-PCR。



1. 制备样品如培养细胞, $20\mu\text{l}$ 全血或者组织裂解液 (最高 2mg , 加 $100\mu\text{l}$ RNA Lysis Buffer)。
2. 每个样品中加入 RNA Lysis Buffer 混匀。
3. 加磁珠到工作板中。
4. 把工作板转移到磁力架上以在孔的一侧捕获磁珠。去除上清, 把板从磁力架上移走。
5. 把样品裂解液转移到含有磁珠的工作板中, 混匀。
6. 把工作板转移到磁力架上以在孔的一侧捕获磁珠。去除上清。
7. 把板从磁力架上移走。
8. 每孔加入 90% 的乙醇, 混匀, 洗涤磁珠。
9. 把工作板转移到磁力架上以在孔的一侧捕获磁珠。去除上清。
10. 把板从磁力架上移走。
11. 加入 DNA 酶溶液, 混匀。室温孵育 10 分钟。
12. 加入 DNA 酶终止液, 混匀。
13. 把工作板转移到磁力架上以在孔的一侧捕获磁珠。去除上清。
14. 重复步骤 8 和 9 两次以上 (DNA 酶处理后乙醇洗涤 2 次)。
15. 在磁珠中加入无 RNA 酶的水, 混匀。
16. 把工作板转移到磁力架上以在孔的一侧捕获磁珠。
17. 将洗脱下来的纯的全 RNA 转移到新的聚丙烯 96 孔板中。 -70°C 保存。

图 1 MagneSil® Total RNA mini-Isolation System 实验流程图



II 产品构成

产品	规格	货号
MagneSil [®] Total RNA mini-Isolation System	4 plate	Z3351

仅限实验室使用。每个试剂盒都有从 4 块 96 孔或者 384 孔板中纯化全 RNA 的足够试剂。包括：

- 100ml RNA Lysis Buffer (RLA), 100 ml
- 20ml MagneSil[®] RNA 磁珠 (PMPs)
- 4 vials DNase I (冻干)
- 25ml Yellow Core Buffer
- 5ml MnCl₂, 0.09M
- 26.5ml DNase 终止液 (储液)
- 150ml 无 RNA 酶的水
- 1 说明书

储存条件：试剂盒室温 (22–25℃) 保存。不要冷冻或冻存 MagneSil[®] RNA PMPs。

须购买的附件

下面列出来的产品是采用 MagneSil[®] Total RNA mini-Isolation System 所必需的但必须单独购买的产品。

96 孔纯化

产品	货号
MagnaBot [®] 96 Magnetic Separation Device	V8151
1/4 inch Foam Spacer	Z3301
Collection Plates(4×96-well U-bottom plates)	A9161

384 孔纯化

产品	货号
MagnaBot [®] 384 Magnetic Separation Device	V8241
384 孔板, 平底	V5291

*仅限实验室使用。

III 使用须知

III.A. 一步法纯化 RNA

成功抽提完整 RNA 需要以下四个步骤：1) 有效破碎的细胞或组织；2) 核蛋白的变性；3) 内源核酸酶的失活；4) 去除污染的 DNA 和蛋白。最关键的是迅速失活在细胞破碎时从结合在细胞膜上的细胞器中释放的内源性核酸酶。

MagneSil[®] Total RNA mini-Isolation System 包含的异硫氰酸胍不仅可以裂解样品，还可以使

核酸蛋白复合物和 RNA 酶失活。此试剂盒是用磁珠从裂解液中捕获总 RNA，然后加入无 RNA 酶的 DNA 酶降解污染的基因组 DNA。然后用乙醇洗涤除去盐，蛋白及细胞杂质进一步纯化总 RNA。最后用无 RNA 酶的水洗脱总 RNA。此方法只需一轮纯化即可得到纯净的总 RNA，勿须有机萃取，沉淀和真空过滤。此方法易于小量的培养细胞或全血在 96 孔或 384 孔板的纯化，也可在 96 孔板中对组织进行纯化。

III.B. 样品容量

MagneSil® Total RNA mini-Isolation System 适用于小规模总 RNA 提取。96 孔板的最大上样量是 1×10^5 个细胞，2mg 组织裂解液（溶于 100ul RNA Lysis Buffer）或者 20ul 全血（来源于正常健康成年人）。用于 384 孔板的最大上样量是 1×10^3 个细胞，或者 5ul 全血。如果样品量高于推荐上样量，磁珠会成团，纯化的总 RNA 在纯度和产量上都受到严重影响。

III.C. 创建无 RNA 酶的环境

RNA 酶不易失活。要尽量避免在纯化中或纯化后引入 RNA 酶，特别是对于很难得到且无法替换的样品尤其重要。以下的注意事项可以帮助你避免 RNA 酶的污染。



为了不影响下游的应用，一定要尽量避免 RNA 酶的污染，试验中要佩戴手套，使用无 RNA 酶的离心管和溶液。DEPC 可以和胺快速反应，所以 Tris 缓冲液不能用它处理。

1. RNA 酶的污染主要来自两个方面，首先是操作的手，其次是空气中的细菌和霉菌。为了避免这些污染，试验中用到的试剂要采用无菌处理。试验过程中必须佩戴手套。
2. RNA 提取中要尽量使用一次性的塑料制品。这些材料都是无 RNA 酶的，无须前处理。
3. 使用非一次性的玻璃和塑料制品时必须进行前处理以保证无 RNA 酶。200℃ 过夜烘烤玻璃制品，塑料制品用 0.1N NaOH, 1mM EDTA 彻底清洗，再用无 RNA 酶的水清洗。
4. 使用中自己配制的溶液必须要加入 DEPC（终浓度 0.1%）室温孵育过夜。30 分钟高压灭菌去除残留的 DEPC。

IV. 开始抽提之前

需要准备的试剂和设备

- 1×PBS(细胞培养用)。在纯化前洗涤细胞
- 90%乙醇
- U 型底 96 孔板（目录号 A9161）
- 磁力架 [96孔 (目录号 V8151) 或者 384孔 (目录号 V8241)]
- 1/4 英寸 Foam Spacer(目录号 Z3301)[96孔板纯化时使用，放置于磁力架 的顶部]
- 排枪
- 培养板振荡器（手动纯化时使用）

IV.A. 溶液的准备

溶液	制备过程	注意事项
DNA 酶 I	加入适量无 RNA 酶的水于冻干的 DNA 酶 I	轻柔混匀。切勿剧烈震荡。 96 孔和 384 孔板仅需 1 瓶。若少于一整板，建议用无菌微型离心管分装 DNA 酶 I。 -20℃ 保存，避免反复冻溶。
DNA 酶终止液	在 DNA 酶终止液中加入 40ml 90%乙醇	加入乙醇后在瓶上做标记。盖紧瓶盖，在 22-25℃ 保存。

DNA 酶溶液	按以下顺序配制： 5.2ml Yellow Core Buffer, 575ul MnCl ₂ , 275ul DNA 酶 I	此溶液需在用前现配。用枪混匀。切勿震荡，此溶液不能储存。
---------	---	------------------------------



DNA 酶溶液要现用现配。

IV.B. 样品的制备

细胞样品

通常每孔可加入 1×10^5 个细胞。如果细胞过多将会降低总 RNA 的产量和纯度。

1. 用无菌的 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤细胞一次。
2. Promega 自动法方法（此方法详见下述）此方法用于平板培养的组织细胞时直接放于自动液体处理平台上。细胞培养液和 PBS 必须在提取前去除。

组织匀浆液

在 RNA 裂解液中充分破碎组织。每孔加入 100ul 裂解液，最多可处理 2mg 组织。如果组织裂解液少于 100ul，用 RNA 裂解液补加至 100ul。如果需要更多的 RNA 裂解液，可采用 SV RNA 裂解液（目录号 Z3051）。

全血

每孔中最多加入 20ul 全血。此样品来源于正常健康成人，血细胞数量在 4.5×10^6 - 1.1×10^7 /ml(2)。可有效纯化不超过 50ul 体积的最高 1×10^5 个细胞。如果样品高于 1×10^5 个细胞会降低 RNA 的产量和纯度。



MagneSil® Total RNA mini-Isolation procedure用于新鲜全血。

V. Biomek® 2000 Laboratory Workstation的全自动RNA纯化

全自动方法参见以下网址 www.promega.com/automethods/

Biomek® 2000程序输入方法参见以下网址：

www.promega.com/automethods/beckman/biomek2000/default.asp

需准备的试剂和设备

- U型底96孔板（目录号A9161）
- U型底96孔聚苯乙烯板（Greiner 目录号650201）
- 深孔板，2.2ml（Marsh Bio Products 目录号AB0932）
- MagnaBot® 96 Magnetic Separation Device（目录号V8151）
- 1/4英寸Foam Spacer（目录号Z3301）
- 90%乙醇
- P250 barrier tips（Axygen Scientific 目录号22234-120）

V.A. 仪器配制

以下Beckman Coulter部件清单和相应的目录号是Biomek® 2000 Workstation使用MagneSil® Total RNA mini-Isolation System所必须的。

说明	数量	目录号
Biomek® 2000 Workstation, 50/60 Hz, 100.120V	1	609000
Biomek® 2000 Controller NT	1	609875
IBM Monitor	1	974571
BioWorks. Version 3.2 for Biomek® 2000	1	609983
Gripper Tool System for Biomek® 2000	1	609001
MP200 Pipetting Tool	1	609025
Tip Rack Holder	2	609121
Gray Labware Holders	5	609120
Reservoir Holder	1	372795
Quarter Vertical Reservoirs	2	372780
Quarter Single Reservoirs	2	372790
DPC Micromix® Shaker	1	380560
DPC Micromix® Shaker Integration Package	1	380561

V.B. Biomek®2000 平台的初始布局

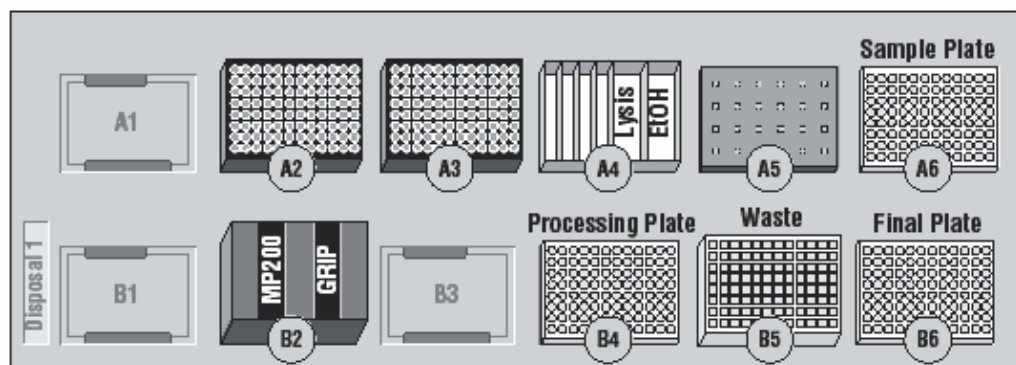


图2. Biomek®2000工作站使用MagneSil® Total RNA mini-Isolation System时平台的初始布局

位置编号	平台的布局
A1	Empty
A2	Tip rack holder, P250 Barrier Tips
A3	Tip rack holder, P250 Barrier Tips
A4	Labware holder, reservoir holder, two quarter vertical reservoirs, two quarter single reservoirs (见下).
A5	Labware holder, MagnaBot® 96 Separation Device, 1/4 inch Foam Spacer on top of 磁力架
A6	Shaker Position, 96-well flat-bottom sample plate (如: Costar® 细胞培养板).
B1	Empty
B2	Tool rack containing MP200 and Gripper tools.
B3	Labware holder
B4	Labware holder, 96-well U-bottom processing plate containing 30µl MagneSil® RNA PMPs per well.
B5	Labware holder, empty 2.2ml 96-well deep well plate

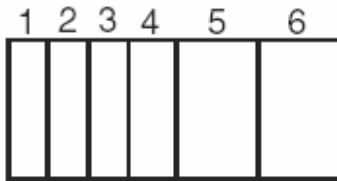
B6 Shaker Position, empty 96-well polypropylene U-bottom plate for eluted purified total RNA



磁珠在使用前充分混匀。

使用Biomek®2000时试剂的加入量：Biomek®2000Workstation运行前各孔需加入的试剂量。

1. 6ml Nuclease-Free Water.



2. 12ml DNase Stop Solution (加乙醇)

3. Empty

4. 6ml DNase Solution (见 IV.A)

5. 12ml RNA Lysis Buffer (若从组织裂解液中纯化RNA此孔空置)

6. 33ml 90% ethanol

V.C. Biomek®2000 特殊情况的设置

用Biomek®2000纯化的样品少于96个

Biomek®2000内置了“MagRNA”模式的程序专用于Total RNA mini-Isolation System。它可以任意编辑以用于纯化样品少于96个的情况。“MagRNA”的默认设置是用于96孔的，如果你的样品少于96个请按照以下的操作编辑程序：

更改程序

1. 在BioWorks™ Software的“Edit”菜单中选择“Patterns”
2. 选择“MagRNA”模式
3. 点击“Edit”
4. 选择“Allow Changes”
5. 点击“Clear”以取消全孔模式
6. 选择MagRNA模式所需的样品数量（默认96孔）
7. 选择“OK”
8. 在“Edit Global Patterns”窗口点击“Close”
9. 检查“MagRNA”模式的样品数量。
- 10.

VI. 使用Biomek®FX Laboratory Workstation自动化纯化RNA

使用者需要自备的耗材

96-well 纯化

- Pyramid-bottom reservoir plates (Innovative Microplate 目录号S30014)
- 96-well U-bottom Collection Plates (目录号A9161)
- Biomek® FX P250 barrier tips (Axygen Scientific 目录号 FXF-180-LRS)
- Deep Well Plate, 2.2ml (Marsh Bio Products 目录号AB0932)
- 96-well U-bottom polypropylene plate, (Greiner 目录号650201) (总RNA纯化洗脱用)
- MagnaBot® 96 Separation Device (目录号V8151)
- 1/4 inch Foam Spacer (目录号Z3301)

384-well 纯化

- Pyramid-bottom reservoir plates (Innovative Microplate 目录号S30014)
- 96-well U-bottom Collection Plates (目录号A9161)
- Biomek® FX P250 barrier tips (Axygen Scientific 目录号 FXF-180-LRS)
- Deep Well Plate, 2.2ml (Marsh Bio Products 目录号AB0932)
- MagnaBot® 384 Separation Device (目录号V8241)
- 384-well Plate, Flat (目录号V5291) (总RNA纯化洗脱用)

VI.A. 仪器配制

以下清单是Biomek®FX Workstation使用MagneSil®Total RNA mini-Isolation System所需的Beckman Coulter配件

描述	数量	订购信息
Minimum: Biomek® FX		
Software Version 2.1	1	联系BeckmanCoulter
96-channel POD	1	联系BeckmanCoulter
Orbital Shaker	1	联系BeckmanCoulter
Minimum number of labware positions accessible by 1 POD		
96-well purification	12	联系BeckmanCoulter
384-well purification	14	联系BeckmanCoulter

VI.B. Biomek®FX的初始设置

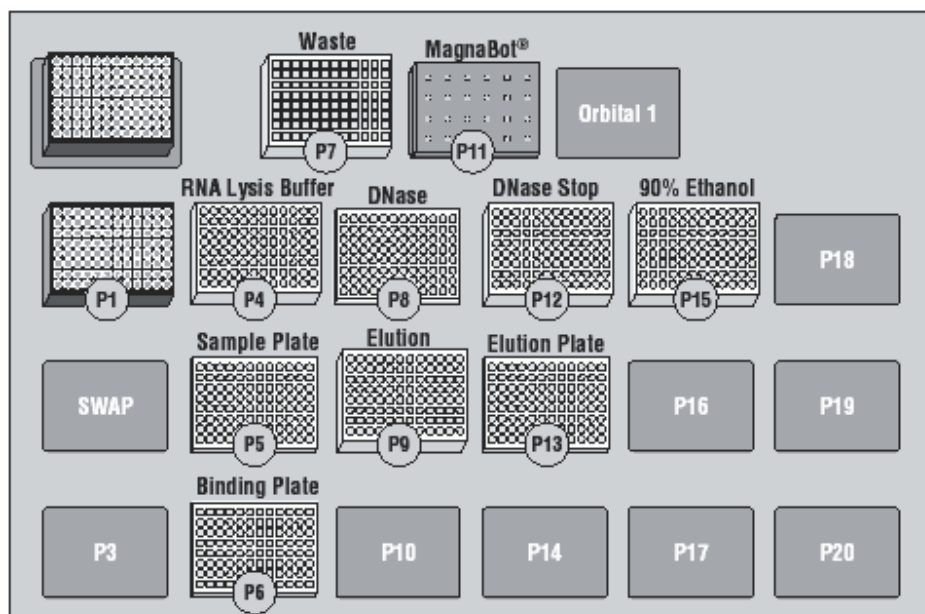


图3. Biomek®FX 96-well 纯化模式的初始设置。以上是MagneSil®Total RNA mini-Isolation System用于Biomek®FX时平台的布局。根据情况的不同你的布局或有不同。

ALP编号 设备

Tip Loader	Biomek® P250 Barrier Tips
P1	Biomek® P250 Barrier Tips
P2	Swap position
P3	Empty
P4	Pyramid-bottom reservoir plate containing 12ml of RNA Lysis Buffer

P5	96-well, flat-bottom culture plate containing sample
P6	96-well, U-bottom plate (结合板) containing 30µl of MagneSil®RNA Paramagnetic Particles per well
P7	Empty 2.2ml deep-well, 96-well plate (用于废液)
P8	96-well, U-bottom plate containing 55µl of prepared DNase Solution per well
P9	Pyramid-bottom reservoir plate containing 25ml of Nuclease-Free Water (洗脱)
P10	Empty
P11	MagnaBot® 96 Magnetic Separation Device with 1/4 inch Foam Spacer
P12	Pyramid-bottom reservoir plate containing 12ml of DNase Stop Solution (加乙醇)
P13	96-well polypropylene U-bottom Collection Plate for purified total RNA (洗脱板)
P14	Empty
P15	Pyramid-bottom reservoir plate containing 50ml of 90% ethanol



磁珠在使用前请充分混匀。

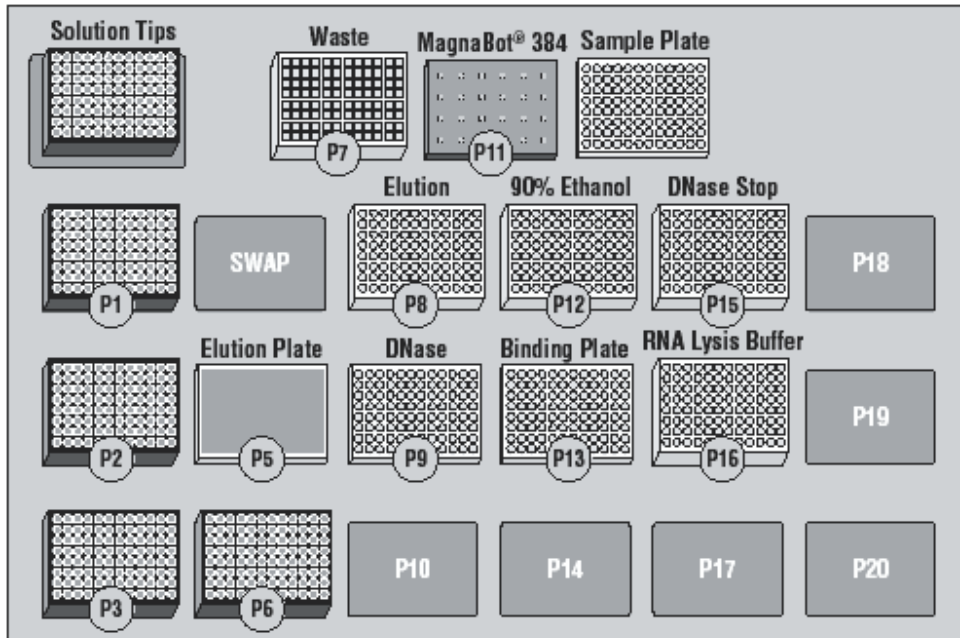


图4. Biomek®FX 384-well纯化模式的初始设置。以上是MagneSil®Total RNA mini-Isolation System用于Biomek®FX时平台的布局。根据情况的不同你的布局或有不同。

ALP 编号	设备
Tip Loader	Biomek® P250 Barrier Tips
P1	Biomek® P250 Barrier Tips
P2	Biomek® P250 Barrier Tips
P3	Biomek® P250 Barrier Tips
P4	Swap position (空置)
P5	384-well plate for purified total RNA
P6	Biomek® P250 Barrier Tips
P7	Empty 2.2ml deep-well, 96-well plate (用于废液)
P8	Pyramid-bottom reservoir plate containing 25ml of Nuclease-Free Water

P9	96-well, U-bottom plate containing 55µl of prepared DNase Solution per well
P10	Empty
P11	MagnaBot® 384 Magnetic Separation Device
P12	Pyramid-bottom reservoir plate containing 60ml of 90% ethanol Orbital 384-well, flat-bottom cell culture plate containing sample
P13	96-well, U-bottom plate (Binding Plate) containing 50µl of MagneSil® RNA Paramagnetic Particles per well
P14	Empty
P15	Pyramid-bottom reservoir plate containing 15ml of DNase Stop Solution (加乙醇)
P16	Pyramid-bottom reservoir plate containing 20ml of RNA Lysis Buffer

磁珠在使用前请充分混匀。

VII. MagneSil® Total RNA mini-Isolation System操作手册的介绍

以下叙述是MagneSil® Total RNA mini-Isolation System在96-well模式下的操作步骤。此操作步骤可用于手动也可用于自动化。VII.C提供了384-well模式的操作方法。如果你需要了解更多自动化操作的方法见VIII。

以下操作手册描述中的96-孔板振荡器（如 DPC Micromix®5 Shaker）用于混匀。所有需要振荡的步骤切忌剧烈以防止溅出，否则会导致样品污染。我们也推荐了DPC Micromix®5 Shaker的设置但不同的仪器需要不同优化。

也可以选择用排枪来混匀，以保证磁珠充分混匀。但手动操作会降低操作速度。

VII.A. 样品制备

纯化前按以下方法制备起始样品：

培养细胞：用1×PBS洗培养细胞。如果使用的是贴壁细胞切忌将细胞从板子上下来。去除1×PBS，开始纯化。

组织裂解液：加入RNA Lysis Buffer。96-孔板每个孔中加入2mg组织和100ul RNA Lysis Buffer。

全血 : 96-孔板中每孔加20ul全血。

VII.B. 操作手册

1. 充分混匀磁珠，然后在96-孔板中每孔加30ul磁珠。



使用前充分混匀磁珠

2. **去除溶液。**将96-孔工作板放置于磁力架上并静置一分钟以把磁珠吸附于一侧。小心的吸走溶液。
3. **样品裂解。**加100ul RNA Lysis Buffer到样品中并用枪混匀或用振荡器（DPC设置：form47,amp;itude7 1分钟）
注意：对于已经用RNA Lysis Buffer裂解过的组织无需再加RNA Lysis Buffer。
4. **捕获核酸。**将样品裂解液转移到含有磁珠的U型96-孔工作板中。在荡器上振荡（DPC设置： from47,amplitude7）2分钟。
5. 将96-孔工作板放置在磁力架上静置一分钟以使结合了核酸的磁珠聚集于孔一侧，去除上清液切忌破坏磁珠。
6. **冲洗。**每个孔加100ul90%的乙醇。将工作板从磁力架上取下置于振荡器上振荡（DPC设置： form 42,amplitude 5）1分钟充分混匀洗涤磁珠。
注意：对于大量的样品（1×10⁵细胞或2mg的组织裂解液）可能会在第六步出现磁珠成团。DNA酶处理及后续的冲洗后会散开。
7. 将96孔工作板放置于磁力架上静置一分钟以使结合了核酸的磁珠聚集于孔一侧。去除上

- 清液。
8. 确保所有洗涤用的乙醇都以除去。把工作板放置于磁力架上1分钟以蒸发残留的乙醇。
 9. **DNA酶处理。**每孔加50ulDNA酶溶液于工作板中。把工作板从磁力架上取下然后放到振荡器上振荡（DPC设置：form 47,amplitude 6）10-15分钟以使DNA酶降解污染的基因组DNA。
 10. **DNA酶的失活。**每孔加100ulDNA酶终止液于工作板中并振荡（DPC设置：form 42,amplitude 4）2分钟以完全混匀磁珠。
 11. 将96孔工作板放置于磁力架上静置1分钟以使结合了核酸的磁珠聚集于孔一侧。去除上清液。
 12. **冲洗。**每个孔加100ul90%的乙醇。将工作板从磁力架上取下置于振荡器上振荡（DPC设置：form 42,amplitude 5）1分钟充分混匀洗涤磁珠。
 13. 将96孔工作板放置于磁力架上静置1分钟以使结合了总RNA的磁珠聚集于孔一侧。去除上清液。
 14. 重复12和13的步骤。
 15. 完全去除剩余的90%的乙醇后静置于磁力架上2分钟以使磁珠干燥。
 16. **洗脱。**加50ulNuclease-Free Water于96孔工作板中。
注意。洗脱体积低于25ul时可以增加总RNA的浓度。
 17. 把工作板从磁力架上转移到振荡器上振荡（DPC设置：form 47,amplitude 6）2分钟以混匀磁珠，洗下纯净的总RNA。
 18. 把96孔工作板放置于磁力架上静置1分钟以捕获磁珠。将含有纯总RNA的上清液转入新的96孔聚苯乙烯板中。于-70℃保存。

注意：加0.5ulRNasin®Plus Rnase Inhibitor（目录号 N2611）于样品中以防总RNA的降解。也可在洗脱时，每50ulNuclease-Free Water加0.5ulRNasin®Plus Rnase Inhibitor。

VII.C. 使用MagneSil®Total RNA mini-Isolation System于384-well模式

96-well的纯化过程已经介绍了。对于384-well的纯化可以参照以上步骤。以下的表格是384-well模式所需各种试剂的量。384-well模式的样品量推荐是： $\leq 1 \times 10^3$ 个细胞或 $\leq 5\mu\text{l}$ 的全血。我们不推荐在384-well模式下做组织裂解液。

Reagent	Volume/Well 96-well Purification	Volume/Well 384-well Purification
RNA Lysis Buffer	100 μl	50 μl
MagneSil® RNA PMPs	30 μl	10 μl
90% Ethanol Washes	100 μl	50 μl
DNase Solution (prepared)	50 μl	12.5 μl
DNase Stop Solution	100 μl	25 μl
Nuclease-Free Water for elution	50 μl	15 μl

MagneSil®Total RNA mini-Isolation System于96-well模式下推荐体积为50ul。洗脱体积可降至25ul以增加浓度而不会降低总RNA的量。洗脱体积小于25ul时会降低总RNA的量。我们不推荐在384-well模式下降低洗脱体积。

VIII. 可选机械化平台使用指南

推荐使用防尘枪头用于MagneSil®Total RNA mini-Isolation System以降低RNA酶的污染。如果使用的是普通的枪头请在使用前充分洗涤枪头。如果系统有吸液步骤那么要尽量减少样品的暴露以降低RNA酶的污染。

每孔样品量不要超过 1×10^5 个细胞，2mg组织裂解液或20ul全血。特别是组织裂解液，一并不超过2mg。确保样品体积在100ul，若不够100ul要加Lysis Buffer至100ul。

充分混匀磁珠以有效的纯化总RNA。磁珠要均等加入到工作板中且在冲洗时要充分混匀。如果磁珠没有充分混匀可能会使孔与孔间的产量产生差异，导致基因组的污染并且会降低RNA的产量和纯度。

加0.5ul的Rnasin Plus Rnase Inhibitor（目录号 N2611）于样品中以防止RNA的降解。也可在洗脱时，每50ul Nuclease-Free Water加0.5ul RNasin®Plus Rnase Inhibitor.

对于RT-PCR分析，只需取10%的最终产品即可切忌超过此量。

IX. 疑难解答

如果你的问题在这里没有答案请联系当地Promega公司或者当地经销商。联系信息可从网上得到：www.promega.com E-mail: techserv@promega.com

问题	原因及建议
RNA产量低	<p>样品起始量太大。MagneSil®Total RNA mini-Isolation System最优纯化的样品量是$\leq 1 \times 10^5$个细胞，≤ 2mg组织的100ul裂解液或≤ 20ul全血。如果超过这个量会降低RNA产量及纯度并且会使磁珠成团难于操作。</p>
	<p>样品裂解液在-20℃和-70℃保存。样品裂解液经过冻存降低总RNA量。裂解最好在纯化前现做。</p>
	<p>样品裂解液经过了反复冻融。这样会促使RNA的裂解。尽量使用新鲜的样品。</p>
	<p>组织培养细胞总RNA含量低。总RNA的量与样品种类是相关的。如果RNA量过低请增加样品起始量</p>
	<p>RNA Lysis Buffer没有加到组织裂解液中。确保所有样品裂解液中加入了RNA Lysis Buffer</p>
	<p>操作步骤错误或试剂使用错误。确保按照MagneSil®Total RNA mini-Isolation System的操作步骤处理以保证操作中RNA始终结合在磁珠上。</p>
	<p>Dnase stop Solution 中没有加乙醇。Dnase stop Solution中一定要加乙醇。见IV.A</p>

问题	原因及建议
RNA产量低（续）	<p>乙醇清洗时浓度错误。乙醇浓度低于90%时会降低产量。纯化前配置90%的乙醇溶液。</p> <p>没有完全混合磁珠。往工作板中加磁珠前一定要充分混合磁珠以使磁珠均匀分散。</p> <p>磁珠的加入量错误。操作中的磁珠加入量是已经优化好的，加入量若有25%的误差就会降低RNA的量（如，纯化1×10^5个细胞需要30ul的磁珠，少于22.5ul或多余37.5ul都是不可以的）</p>
DNA污染	<p>Dnase Solution配置错误。每个板子需用5.2ml Yellow Core Buffer, 575ul $MnCl_2$ 及275ul DNase I配成Dnase Solution。</p> <p>Dnase Solution孵育不充分。Dnase Solution孵育时间最少10分钟，也可加到20分钟。</p> <p>Dnase Solution在使用前保存过或冻存过。Dnase Solution必须在使用前配置，不能保存。</p>
磁珠成团	<p>样品量太大。MagneSil® Total RNA mini-Isolation System纯化的样品量是$\leq 1 \times 10^5$个细胞，$\leq 2mg$组织的100ul裂解液或$\leq 20ul$全血。</p> <p>裂解液浓度太高。如果裂解液过粘那么用RNA Lysis Buffer稀释至可用枪头吸入</p> <p>没有完全混合。在冲洗和孵育步骤中要充分混匀磁珠。</p>
问题	原因及建议
RNA降解	<p>操作中引入了RNA酶。使用无RNA酶的塑料及玻璃制品。操作中的枪头必须是有过滤功能的，且须带手套。引入的RNA酶在洗脱后降解RNA</p>

X.应用文献

1. Chirgwin, J.M. *et al.* (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched with ribonucleases. *Biochemistry* **18**, 5294.9.
2. Henry, J.B. (2001) Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 20th Edition, W.B. Saunders Company, Chapter 24, p. 509.



XI.相关产品

产品	包装	目录号
RNasin® Plus RNase Inhibitor	2,500 units	N2611
	10,000 units	N2615
SV 96 Total RNA Isolation System	1 × 96	Z3500
	5 × 96	Z3505
SV RNA Lysis Buffer	50ml	Z3051
Reverse Transcription System	100 reactions	A3500
AMV Reverse Transcriptase	300 units	M5101
	1,000 units	M5108
ImProm-II. Reverse Transcription System	100 reactions	A3800
ImProm-II. Reverse Transcriptase	100 reactions	A3802
	500 reactions	A3803
M-MLV Reverse Transcriptase	10,000 units	M1701
	50,000 units	M1705

实验室用。