

UPure Tissue RNA Kit (N1002)
动物组织、细胞 RNA 自动化提取 SOP
适配 Allsheng Auto-Pure 32A
版本号-V2001

实验前准备工作：

1. 实验用具和耗材：剪刀、镊子、止血钳、研钵等进行无 RNase 处理。
2. 自动化提取仪：用外源 RNase 清除剂对提取仓内部进行擦拭清除 RNase。
3. Buffer 制备：首次开封使用时，按照瓶身标签所示，向 **Buffer TBB**、**Buffer PBR2** 和 **Buffer PBR4** 中加入无水乙醇并混匀。
4. 85%乙醇：实验过程中需使用 85%乙醇，请注意使用无酶水制备 85%乙醇。
5. DNase I 制备：使用试剂盒中提供的 **DNase dissolve Buffer** 溶解 DNase I 干粉。
6. Buffer 检查：使用前请确定 **Buffer TLB**、**Buffer TBB**、**Buffer PBR2** 和 **Buffer PBR4** 没有晶体析出，若有晶体析出可 37℃ 温浴使析出的晶体复溶。
7. 提前打开金属浴或者水浴，调节温度至 56℃。

一、样本预处理

1、培养细胞

- A1. 将贴壁培养细胞处理为细胞悬液，取全部细胞（ $10^6 \sim 10^7$ 个）连同 1ml 左右培养液加入离心管内；
- A2. 10000rpm 离心 1min，去除全部上清；
- A3. 加入 1ml 的 1×PBS 工作液，重悬细胞沉淀，10000rpm 离心 1min，去除全部上清；
- A4. 每份细胞样本加入 350μl **Buffer TLB** 和 10μl **Proteinase K**，将细胞沉淀全部重悬后，于 56℃ 加热处理 15min，期间可以 800rpm 进行混匀（注意：为提高得率，可在加入 350μl **Buffer TLB** 和 10μl **Proteinase K** 同时加入 5-6 颗直径 3mm 左右的钢珠，在组织匀浆仪上匀浆 30S*2 次后再 56℃ 加热处理。）
- A5. 处理完成后，将样本管 12000rpm 离心 5min，小心的吸取 350μl 处理液上清加至 96 孔板进行提取；

2、组织样本

A.液氮研磨

- A1. 向干净的 2ml 离心管中加入 370-390μl **Buffer TLB** 和 10μl **PK 酶** (20mg/ml)；
- A2. 液氮冰冻研磨至组织样本成粉末状，取不大于 15mg 的组织样本至 B1 的离心管中，涡旋混匀；
- A3. 56℃ 处理 15min；
- A4. 将处理后的上清液 350μl 转移至 96 孔深孔板进行提取。

B.组织匀浆器

- B1. 向干净的 2ml 离心管中加入 370-390 **Buffer TLB** 和 10μl **PK 酶** (20mg/ml);
- B2. 取不大于 15mg 的组织样本加入 B1 离心管内, 组织匀浆机破碎, 短暂离心将组织聚集于管底;
- B3. 56℃处理 15min;
- B4. 12000rpm 离心 5min, 转移上清液 350μl 至 96 孔深孔板进行提取。

二、上机处理

1. 取 96 孔板, 按照下表加入样本和试剂至孔中。

注意: 每一孔的总体积不能超过 950μl, 否则可能溢出。

表 1. 96 孔板板面设置及试剂用量

96 孔板孔位	样本/试剂	体积(μl)	说明
第 1 列/第 7 列	样本处理上清	350	—
	Buffer TBB	550	使用前确认是否按比例加入无水乙醇。
	Tissue RNA Beads	40	Tissue RNA Beads 容易沉底, 使用前务必混匀磁珠使其介质均一, 以确保加入各实验管时无差异。
第 2 列/第 8 列	Buffer PBR2	700	使用前确认是否按比例加入无水乙醇。
第 3 列/第 9 列	Buffer PBR3	144	—
	DNase I	6	—
第 4 列/第 10 列	85%乙醇	800	—
第 5 列/第 11 列	85%乙醇	800	—
第 6 列/第 12 列	RNase-free H ₂ O	70	洗脱体积可根据具体要求调整, 至少加入 70μl。

2. 启动仪器, 在仪器中放置好磁棒套, 并将装有样品和试剂的 96 孔板放到仪器中, 与磁棒套相对应。

注意: 加有试剂的孔位一定要放好磁棒套, 否则会腐蚀磁棒, 影响后续实验。

3. 执行程序 “Tissue RNA-1”

表 2. Tissue RNA-1 程序设置

孔位	步骤名称	混合时间(min)	吸磁时间(sec)	等待时间(min)	容积(μl)	混合速度(1-10)	温度(℃)	混合位置(1-100%)	混合幅度(1-100%)	吸磁位置(1-100%)	吸磁速度(1-10)
1	Binding	5	60	0	900	8	off	0	80	0	1
2	Wash 1	2	60	0	800	8	off	0	80	0	1
3	DNase	2	0	0	150	8	off	0	80	0	1
3	DNase	18	0	0	150	3	off	0	80	0	1

4. 程序 “Tissue RNA-1” 完成后, 向第 3 列/第 9 列均加入 700μl **Buffer PBR4** (使用前确认是否按比例加入无水乙醇), 执行程序 “Tissue RNA-2”。

注意: 此时更换磁棒套可提高产物 260/230 的比值。

表 3. Tissue RNA-2 程序设置

孔位	步骤名称	混合时间(min)	吸磁时间(sec)	等待时间(min)	容积(μl)	混合速度(1-10)	温度(℃)	混合位置(1-100%)	混合幅度(1-100%)	吸磁位置(1-100%)	吸磁速度(1-10)
3	Wash 2	3	60	0	900	8	off	0	80	0	1
4	Wash 3	2	60	0	900	8	off	0	80	0	1
5	Wash 4	2	60	5	900	8	off	0	80	0	1
6	Elution	5	90	0	70	8	45	0	80	0	1
5	Release	1	0	0	900	5	off	0	80	0	1

5. 程序完成后，可将提取板放置磁力架上 3-5min 后吸出洗脱产物。第 6 列和第 12 列中为洗脱产物。建议将洗脱产物分装至干净的离心管中，保存于-80℃，避免反复冻融。