

# Stratagene Absolutely RNA 96 孔板微量提取试剂盒与 Bravo 自动化液体处理平台联合应用

## 技术手册

### 作者

欧文·哈迪与史蒂夫·拉普

安捷伦科技

圣克拉拉，美国加州

### 摘要

安捷伦科技的自动化解决方案部门和 Stratagene 部门联合开发了利用 Bravo 自动化液体处理平台和 Absolutely RNA 96 孔板微量提取试剂盒以实现在 96 孔板中自动化抽提 RNA 的新方法。现在 RNA 抽提方法需要大量人工操作，包括重复性的移液和真空抽滤步骤。使用安捷伦 VWorks 自动化控制软件，可以编制一个程序完成吸液，分液，混匀，从 96 孔组织培养板转移样品至 96 孔全基因组 RNA 试剂盒吸附收集板，还能应用 Bravo 平台上配备的真空抽滤模块来自动完成样品洗脱的步骤。最后，可以利用安捷伦的 2100 生物分析系统对 RNA 的质量进行评估。



**Agilent Technologies**

## 介绍

应用 Stratagene Absolutely RNA 96 孔板微量提取试剂盒能高通量地提取细胞样品中的总 RNA。该方法利用 96 孔硅纤维板从细胞裂解液中选择性地结合 RNA，不仅提取方法简单，且不再使用有毒的酚氯仿抽提和耗时的乙醇沉淀。不过，重复的洗脱、过滤和离心等步骤仍旧十分繁琐，如果辅以安捷伦自动化解决方案则能完美地解决这一难题。Bravo 平台有 9 个台板/工作站，完全适用于 96 孔 RNA 提取。以下是一套（3 个实验流程组成）以 Bravo 平台为例自动化完成吸附，DNA 酶处理，清洗和 RNA 洗脱的实验方案。

## 实验材料

- 安捷伦 Bravo 自动化液体处理平台 (G5409A)
- 96-LT 通道可更换移液头(04730-202)
- 安捷伦真空抽滤工作站(G5432A)
- 安捷伦 96-LT 200 微升无菌，带过滤的枪头(08585-102)
- 安捷伦 Vworks 自动化控制软件
- Stratagene 总 RNA 提取试剂盒 (#400793 or #400794)
- 96 孔组织培养皿（例如 Costar 平底聚苯乙烯微孔板, #3598）
- 缓冲液存储池和/或 96 孔板（准备试剂和处理废液）
- 安捷伦微孔板离心机或其他离板机 (G5405A)
- 环丁砜(Sigma # T22209)
- 乙醇

## 实验流程

Absolutely RNA 抽提可分为三个主要步骤：

1. 准备细胞溶解液并吸附到微孔板硅纤维网上
2. DNA 酶处理（可选）
3. 清洗和洗脱

以下是每一主要步骤总结：

### 裂解和吸附

1. 从组织培养皿中吸取基液
2. 加入裂解缓冲液到培养皿中
3. 加入 80%环丁砜溶液到培养皿中并混匀
4. 转移溶解产物到 Absolutely 96 孔吸附板中
5. 真空抽滤

### DNA 酶处理（可选）

1. 在吸附板中加低盐洗液
2. 真空抽滤
3. 离心干燥
4. 加 DNA 酶到吸附板中并孵育

### 清洗和洗脱

1. 在吸附板中加入高盐洗液
2. 真空抽滤
3. 在吸附板中加低盐洗液
4. 真空抽滤
5. 重复第 3 步和第 4 步
6. 离心
7. 加入洗脱缓冲液到吸附板中并孵育
8. 离心

使用 Vworks 自动化控制软件，可为三个主要步骤分别编写有关程序。Bravo 平台上配置的专属硬件在首次使用时需要预设，以便运行时移液头移动到相关的台板位置，软件中已预设了像真空抽滤装置和枪头盒这样的附件。这三个程序可独立运行，以配合可选 DNA 酶处理程序。

## Absolutely 96 缓冲液制备

请根据使用手册制备 Absolutely 96 孔板 RNA 提取试剂盒专用的试剂及缓冲液。需要特别指出的是，(1) 先将冷冻干燥的无 RNA 酶的 DNA 酶 I 溶于试剂盒配给的缓冲液形成母液，取 100  $\mu$ L 此液稀释至 5 mL 稀释缓冲液中，满足每块 96 孔板所需，(2) 清洗缓冲液用 100%酒精稀释到 1X，(3) BME 加到裂解液中，(4) 100%环丁砜用无 RNA 酶的水稀释到 80%。

使用 Bravo 平台可遵循如下步骤：

80%环丁砜可能需要在储液池中过量配置（20 mL 对于处理 2 块 96 孔板是足够的，当处理量更多，需要使用储液池时要多准备）。对于 DNA 酶 I，洗脱缓冲液，裂解缓冲液和高盐缓冲液在每个孔分别需要量：50  $\mu$ L, 30  $\mu$ L, 100  $\mu$ L 和 500  $\mu$ L。这些溶液需要分装到 96 孔板中再使用在 Bravo 平台上分液。如果需要，Bravo 也能够用于准备这些试验微孔板。对于低盐洗液，储液池中加入 200 mL 足以满足一块板在 RNA 抽提中的需要。

### 离心

微孔板需要从安捷伦 Bravo 真空抽滤工作台上移走，用离心机以 1100 g 速度离心。如果将 Bravo 和安捷伦微孔板离心机结合，则可以实现离心过程的自动化。

### RNA 分析

12 个孔（4 个角和中间列行）的总 RNA 在 BioAnalyzer 2100 芯片分析系统上用安捷伦 RNA 6000 Nanochip 上测读，并使用 BioAnalyzer 2100 专家软件（B.02.06 版本）评估样品质量。

表 1: Bravo 设置举例

台板位置	吸附	DNA 酶处理	洗脱
1	Absolutely 96 孔吸附板置于真空抽滤台上	Absolutely96 孔吸附板置于真空抽滤台上	Absolutely96 孔吸附板置于真空抽滤台上
2	样品组织培养皿	DNA 酶溶液处理微孔板*	空
3	环丁矾储液池	空	空
4	低盐洗液池	低盐洗液池	低盐洗液池
5	废液池	空	空
6	裂解缓冲液		洗脱缓冲液*
7	空	空	高盐洗液池
8	可过滤枪头盒	空	可过滤枪头盒*
9	可过滤枪头盒	可过滤枪头盒*	可过滤枪头盒*

\* 在每次运行试验前，微孔板需要被移除。Bravo 的移液头上可配置抓板器根据实验需要将微孔板移动到空的台板上

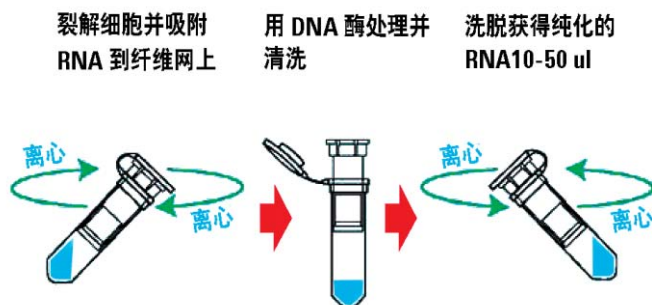


图 1. Absolutely RNA 提取试剂盒提取方法



图 2. 裂解和吸附步骤的 Bravo 平面示意图



图 3. DNA 酶处理步骤 Bravo 平面示意图

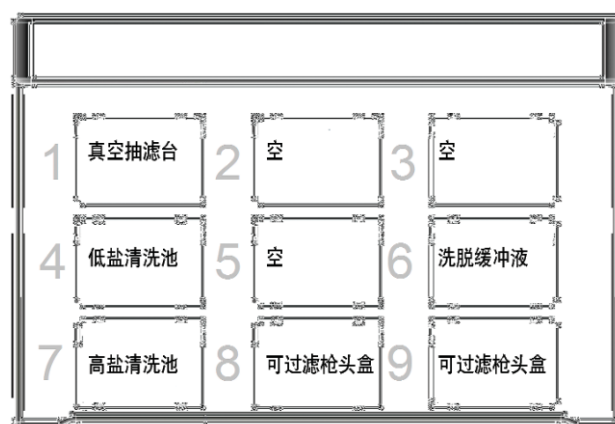


图 4. 清洗和洗脱步骤 Bravo 平面示意图

## 结果和结论

RNA 抽提步骤完成后，从 96 孔组织培养皿中取出 4 个角孔和中间行的样品，用安捷伦 BioAnalyzer 2100 芯片系统分析评估已抽提 RNA 的质量和是否没有基因组 DNA 污染物。图 5 是用 BioAnalyzer 2100 专业软件得到的，具有代表性的分离图谱，上图是 4 个角的样品，下图是中间行的样品，样品图重叠。注意表征 RNA 完整性的 18S 和 28S 核糖体 RNA 峰形尖锐，明显的“小 RNA”峰，完全没有基因组 DNA 污染。RNA 完整量在 2100 专业软件中计算出高达 9.2 到 9.6。

总的来说，这些结果证明了安捷伦 Bravo 自动化液体处理平台和 Absolutely RNA 提取试剂盒结合用在自动化提取总 RNA 上是成功的。

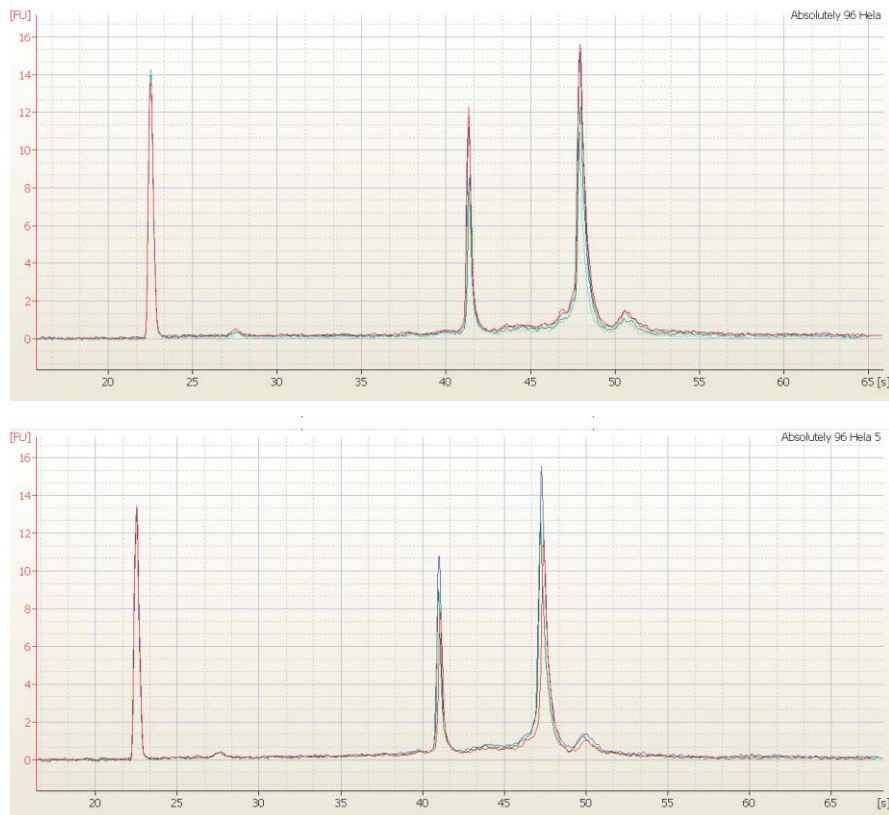


图 5. 应用安捷伦 BioAnalyzer 2100 芯片分析系统得到的分离图谱。使用安捷伦 Bravo 自动液体处理平台和全 RNA 提取试剂盒从 HeLa 细胞中得到的总 RNA，微孔板 4 个角样品（上图）和微孔板中间列样品（下图）的图谱完全重叠。用安捷伦 2100 分析软件对样品进行有无基因组 DNA 污染物及 RNA 品质测定。软件分析显示 RNA 完整量 (RIN) 达到了 9.2-9.6

[www.agilent.com/lifesciences/automation:cn](http://www.agilent.com/lifesciences/automation:cn)

本项目仅供研究参考。不可用于诊断。本资料中涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

© 安捷伦科技公司，2009  
中国印刷 2009 年 4 月 2 日  
5990-3558CHCN



**Agilent Technologies**