

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 μ 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超量配置（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 μ L, 30 μ L, 100 μ L 和 500 μ 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 真空抽滤工作站上移走，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	环丁砜储液池	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

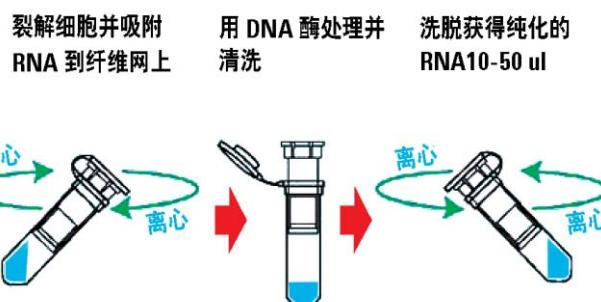


图 1. Absolutely RNA 提取试剂盒提取方法



图 2. 裂解和吸附步骤的 Bravo 平面示意图

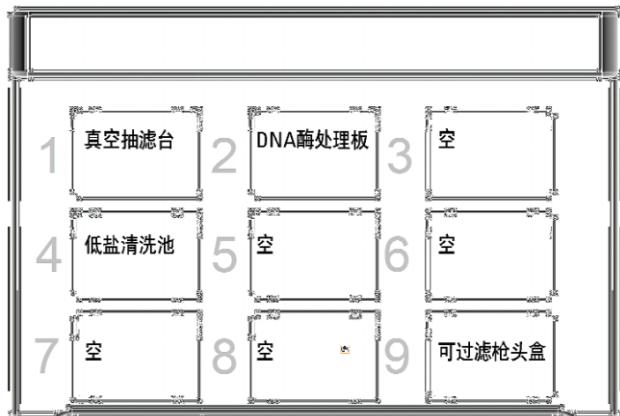


图 3. DNA 酶处理步骤 Bravo 平面示意图



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。

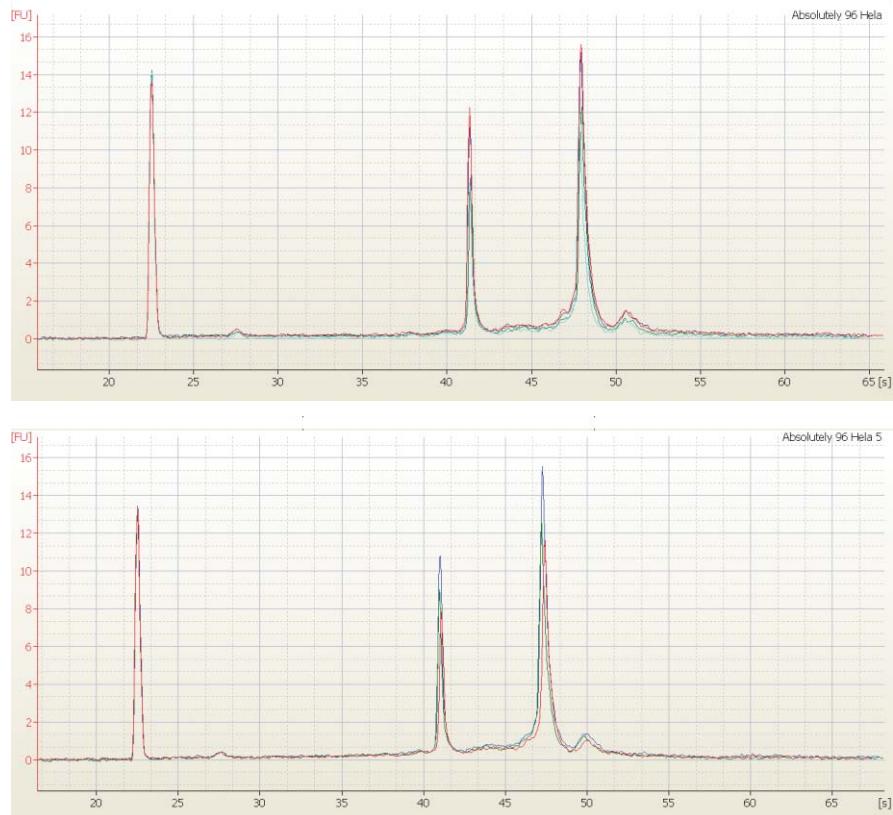


图 5. 应用安捷伦 BioAnalyzer 2100 芯片分析系统得到的分离图谱。使用安捷伦 Bravo 自动液体处理平台和全 RNA 提取试剂盒从 HeLa 细胞中得到的总 RNA, 微孔板 4 个角样品 (上图) 和微孔板中间列样品 (下图) 的图谱完全重叠。用安捷伦 2100 分析软件对样品进行有无基因组 DNA 污染物及 RNA 品质测定。软件分析显示 RNA 完整量 (RIN) 达到了 9.2-9.6

www.agilent.com/lifesciences/automation:cn

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