



BGMG Fast Total RNA Kit

(通用型总RNA提取试剂盒)

CAT. NO. ZJ0050-S (50T) ZJ0050-L (100T)

产品说明:

本产品利用裂解液快速从样本中释放RNA,磁珠在特定的缓冲液条件下与RNA结合并在磁场的作用下富集RNA;相对于用柱子收集RNA,所获得的总RNA包含小片段RNA,且所获得RNA量显著高于柱式收集法;当样品量较小时,可以用小体积的DEPC水溶解以提高RNA浓度;本产品不适合多糖多酚样品提取(多糖多酚样品提取请使用我司生产的 ZJ0060通用型RNA/DNA共提取试剂盒)。

产品组成: 请使用前在对应组分的瓶盖及标签上用马克笔标注序号(①②③...),方便后续使用。

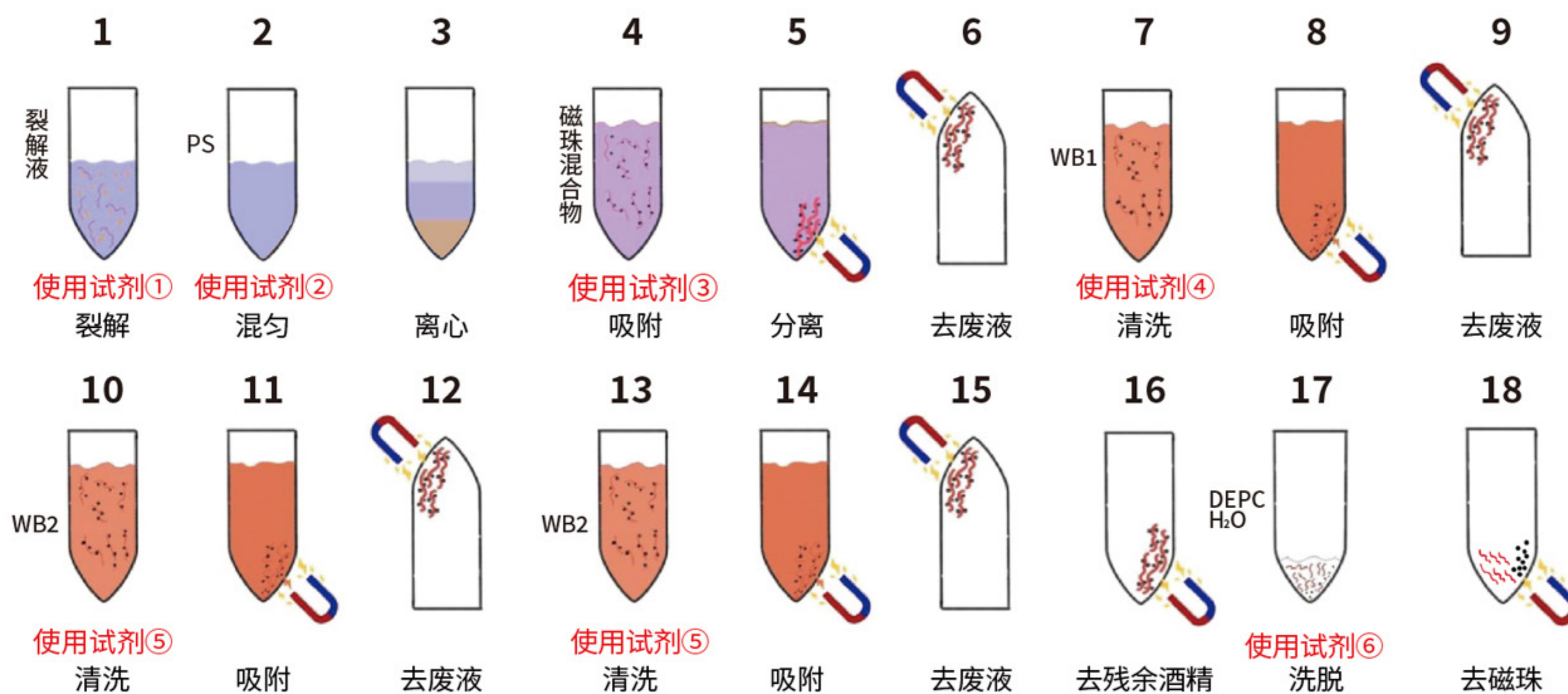
产品组分	ZJ0050-S	ZJ0050-L
① ZJ RNAex Lysis Buffer (单独包装,货号 ZJ0047)	50ml	100ml
② PS	10ml	20ml
③ BGMG For RNA	0.5ml(50mg) [#]	1ml(100mg) [*]
④ RNA WB1	12ml ^{##}	24ml ^{**}
⑤ RNA WB2	16.5ml ^{###}	33ml ^{***}
⑥ DEPC-Treated ddH ₂ O	3ml	6ml

特别注意:

ZJ0050-S(50T):[#] 使用前需加入50ml 无水乙醇,^{##}使用前加入21ml无水乙醇,^{###}使用前需加入38.5ml无水乙醇;如已加乙醇,请做好标记;
ZJ0050-L(100T):^{*}使用需加入100ml 无水乙醇,^{**}使用前加入42ml 无水乙醇,^{***}使用前需加入77ml无水乙醇;如已加乙醇,请做好标记;

注意事项:

1. 无水乙醇、磁力架、1.5ml 无菌无酶离心管、2ml 无菌无酶离心管需自备;
2. 实验中所使用的所有容器都需要用DEPC处理或者直接购买RNase-Free商品化产品;
3. 实验中所使用的无水乙醇需要新开封或者专用于RNA提取;
4. 倒去上清时需将离心管置于磁力架或者替代磁场中,以免磁珠损失。



使用说明:

1. 样本预处理

研磨及裂解样本

植物、组织、真菌使用液氮研磨或组织匀浆, RNA提取质量与研磨程度相关;加入1ml① ZJ RNAex Lysis Buffer, 涡旋10S, 常温静置5-10min;

贴壁细胞除去培养基后用1ml① ZJ RNAex Lysis Buffer 吹打10次使得细胞脱离培养介质, 然后转移至1.5ml或2ml RNase-Free 管中, 涡旋10S 辅助破胞, 常温静置5-10min;

悬浮细胞低转速离心收集细胞, 弃上清后转移至1.5ml或2ml RNase-Free管, 加入1ml① ZJ RNAex Lysis Buffer, 反复吹打或涡旋10S辅助破胞, 常温静置5-10min;

注意: 如果细胞数量极少(小于 5×10^5)不建议使用本产品。推荐贴壁细胞6-10 cm², 悬浮细胞 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ 。大于推荐细胞量, 请增加500ul① ZJ RNAex Lysis Buffer.

细菌类样本离心收集约2ml 菌体, 弃上清后转移至1.5ml或2ml RNase-Free管, 加入1ml① ZJ RNAex Lysis Buffer, 涡旋10S震荡混匀后65°C处理5-10min 辅助破胞(细菌类样本必须65°C处理, 否则将严重影响RNA得率。65°C处理后无需再常温静置, 多数细菌样本不需要研磨, 65°C处理10min 即可破胞, 少数细菌如革兰氏阳性菌需溶菌酶或者研磨辅助破胞);

液体类样本如血清、血浆取样200-300ul, 转移至1.5ml或2ml RNase-Free 管, 加入1ml① ZJ RNAex Lysis Buffer, 涡旋10S, 常温静置5-10min;

2. 加入200ul②PS剧烈震荡或涡旋10S;

3. 13000rpm离心10min (室温离心), 离心后将上清约600ul转移到1.5ml或2ml RNase-Free离心管中(最下层为有机层, 中层为蛋白质层, 最上层为核酸溶液层, 最上层为所需要的上清层, 切勿吸取到中间蛋白质层。为确保纯度, 可只吸取500ul上清);

4. 加入与上清体积的③BGMG For RNA (使用前用力摇晃, 使磁珠均匀分散) (确认拆封时已加入无水乙醇, 剧烈震荡或涡旋10S(让磁珠充分吸附核酸), 室温静置30S;

注意: 离心管盖上有时会残留磁珠, 下一步通过颠倒磁力架, 使磁珠富集在一起;

5. 将装有混合物的离心管放置到磁力架上, 静置10S, 直至磁珠被全部吸附 (静置时间与磁场强度相关, 可以根据观察溶液澄清程度确定静置时间, 如使用12孔磁力架, 建议使用2ml RNase-Free离心管, 与磁力架更加贴合);

6. 在磁力架上倒去上清;

7. 脱离磁场加入500ul④RNA WB1(确认拆封时已加入无水乙醇), 剧烈震荡或涡旋10S(剧烈分散纳米磁珠, 否则将影响纯度);

8. 将离心管再次放入磁力架, 静置10S(静置时间与所处磁场强度相关);

9. 在磁力架上倒去上清;

10. 脱离磁场加入500ul⑤RNA WB2(确认拆封时已加入无水乙醇), 剧烈震荡或涡旋10S(剧烈分散纳米磁珠, 否则将影响纯度);

11. 将离心管再次放入磁力架, 静置10S(静置时间与所处磁场强度相关);

12. 在磁力架上倒去上清;

13. 脱离磁场, 再次加入500ul⑤RNA WB2, 剧烈震荡或涡旋10S(剧烈分散纳米磁珠, 否则将影响纯度);

14. 将离心管再次放入磁力架, 静置10S(静置时间与所处磁场强度相关);

15. 在磁力架上倒去上清;

16. 清除残留乙醇*;

*清除残留乙醇方案:

a) 用枪头吸掉底部和盖子上残留的液体, 并开盖让乙醇挥发10-15min, 等待期间会有液体再次聚集在管底, 需要再次吸弃;

b) 瞬时离心后将离心管放回磁力架中, 吸弃管底残余液体, 开盖挥发10min;

*清除残留乙醇的程度至关重要:乙醇清除程度不够,会影响最终RNA浓度(浓度过低)。乙醇清除程度过大(时间过久),会导致RNA被磁珠牢牢吸附,DEPC-Treated ddH₂O无法从磁珠上洗脱RNA。

判断清除残留乙醇到合理程度有3种方法:

- a)把离心管放入磁力架中,乙醇清除时间在10-15分钟;
- b)把离心管放入磁力架中,通过观察磁珠表面的反光程度,当发现反光程度降低到原有的一半左右,即可;
- c)把离心管放入磁力架中,通过观察磁珠表面的龟裂情况,当发现磁珠表面刚出现龟裂时,即可;

17. 加入50-100 μ l⑥DEPC-Treated ddH₂O处理水,剧烈震荡或涡旋10S使得磁珠完全重悬(细胞等建议用25-50 μ l洗脱,首选25 μ l洗脱,如RNA浓度过大,逐步增加洗脱体系);

18. 将离心管再次置于磁力架上,澄清的溶液即为RNA溶液(可带磁珠保存)。

重要说明:

1.关于PS 的选择性添加使用:

PS 为氯仿类似物,可抽提有机溶剂、变性沉淀蛋白。使用PS 后,会使得上清液杂质显著减少,因而对于操作不熟练的客户,可以提高RNA提取纯度。如果操作熟练后可以不使用PS 同样能得到高纯度的RNA (此时步骤3中上清可吸取950 μ l);

2.关于如何提高RNA的纯度与浓度:

提高纯度的方法:

a)如果使用PS, 蛋白质层在中间,如果不使用PS, 蛋白质层在最下面,吸取上清液时,若吸到蛋白质层,则会导致260/280比值偏低。此外,如果由于磁珠清洗不到位,导致BG RNAex Lysis Buffer残留,也会使260/280比值偏低。如果260/280比值异常,浓度检测会偏离真实值(虚高)。通过琼脂糖凝胶电泳来判断污染类型。如果在点样的孔道附近亮,则为蛋白污染,且污染越严重,孔道附近越亮;

b)纳米磁珠表面富有活性基团,在高浓的乙醇环境中,牢牢的吸附核酸。虽然磁珠不会特异吸附杂质,但会轻微附着在表面,且磁珠比重高,容易沉淀,如果有杂质包裹在磁珠之间未得到有效清洗,则会导致260/280,260/230异常。**有效清洗:适当增加涡旋时间,如涡旋20S**,以分散每一颗磁珠。一共有四次需要分散磁珠(吸上清后、WB1一次、WB2两次);

c)如果不使用PS,260/280在1.8左右,使用PS后260/280可达到2.0-2.2(两种对于反转录定量均可)。如果清洗过程中磁珠未充分分散,磁珠之间包含有杂质,在最后一步加入DEPC水后,磁珠会严重挂壁且明显结块,此种情况RNA纯度会很低,需重做实验(轻微挂壁、黏附在管壁是正常现象,可放入磁力架中取出RNA 溶液,也可以带磁珠保存);

d)上清液溶解有RNA,在保证不吸取到沉淀的情况下,尽量多吸取上清,如果有吸取到轻微沉淀后续清洗也能去除,如果有吸取到大量沉淀,建议用WB2清洗三次;

提高浓度的方法:

a)适当增加样本量,具体的量可能根据不同样品进行调整(增大加样量至2倍);

b)增加细胞吹打强度,提高细胞破碎的比例;

c) 加入 ZJ RNAex Lysis Buffer后,4度处理10min有助于蛋白质与核酸分离,提高核酸提取效率;

d)可减少最终DEPC水体积。