



# BGMG Cell Total RNA Kit

## (细胞总RNA提取试剂盒)

CAT. NO. ZJ0055-S (50T) ZJ0055-L (100T)

### 产品说明:

本产品利用裂解液快速从细胞中释放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 ZJ 0065细胞RNA/DNA共提取试剂盒或 ZJ 0060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	ZJ0055-S	ZJ0055-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) <sup>#</sup>	1ml(100mg) <sup>*</sup>
④ RNA WB1	12ml <sup>##</sup>	24ml <sup>**</sup>
⑤ RNA WB2	16.5ml <sup>###</sup>	33ml <sup>***</sup>
⑥ DEPC-Treated ddH <sub>2</sub> O	3ml	6ml

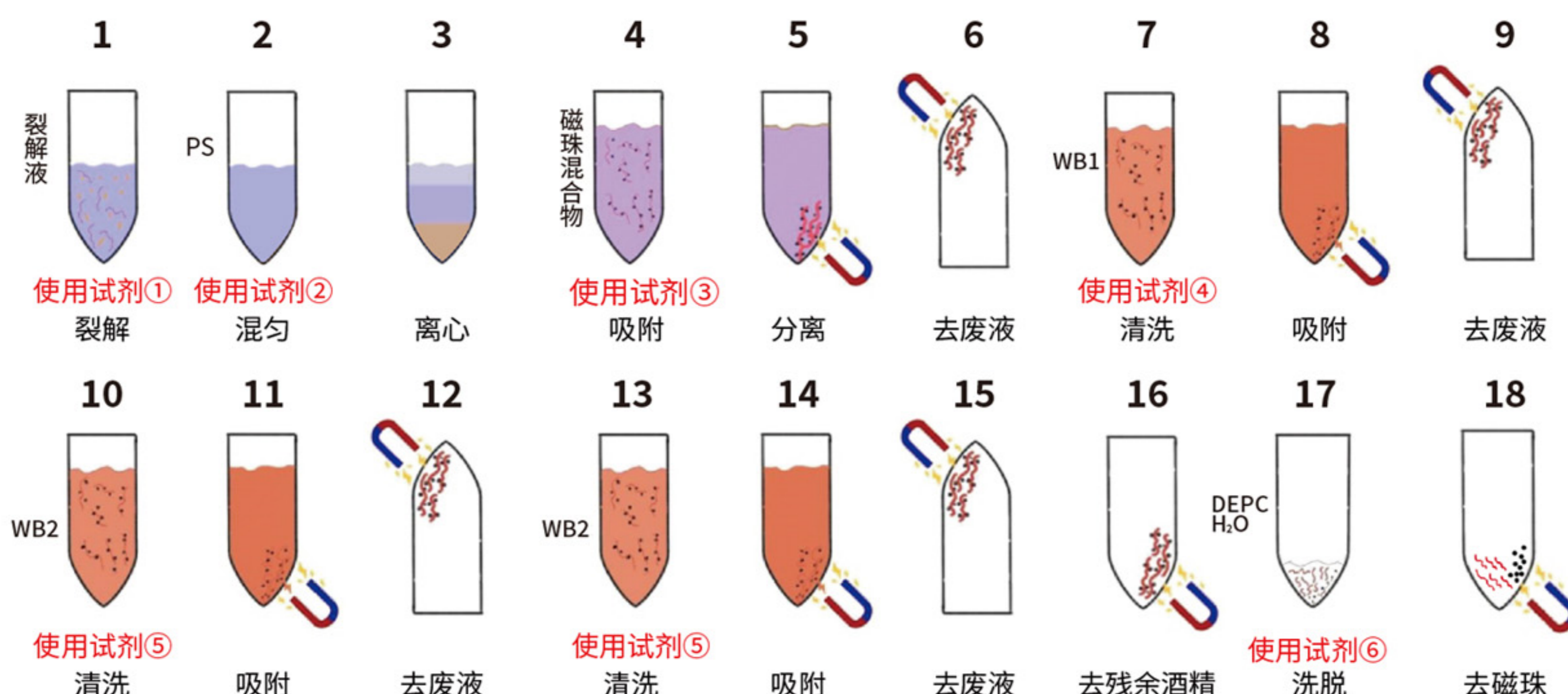
### 特别注意:

ZJ0055-S(50T): <sup>#</sup> 拆封时需加入50ml 无水乙醇, <sup>##</sup> 拆封时加入21ml无水乙醇, <sup>###</sup> 拆封时需加入38.5ml无水乙醇; 如已加乙醇, 请做好标。

ZJ0055-L(100T): <sup>\*</sup> 拆封时需加入100ml 无水乙醇, <sup>\*\*</sup> 拆封时加入42ml 无水乙醇, <sup>\*\*\*</sup> 拆封时需加入77ml无水乙醇; 如已加乙醇, 请做好标。

### 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、收集细胞:

a. 悬浮细胞的收集:估计细胞数量, 300×g或者4000rpm离心5 min, 将细胞收集到离心管中, 仔细吸除所有培养基上清。

b. 单层贴壁细胞的收集:确定细胞数量, 彻底吸除细胞培养基上清, 立即进行第2步裂解步骤。

注意:收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净, 否则会导致裂解不完全, 造成RNA的产量降低。

### 2、裂解处理

对于离心得到的细胞沉淀:将细胞移至1.5ml或2ml RNase-Free离心管中, 加入适量裂解液① ZJ RNAex Lysis Buffer (用量详见下表), 反复吹打或者涡旋10S辅助破胞, 4°C静置10min。

对于直接裂解的细胞:加入适量裂解液(用量详见下表), 用枪头吹打或用细胞刮刀将细胞刮离培养皿, 然后转移至1.5ml或2ml RNase-Free离心管中, 反复吹打或者涡旋10S辅助破胞, 4°C静置10min。

细胞数量	裂解液 (ul)
$3 \times 10^6 - 5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 7 \times 10^6$	500
$7 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	650
$1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$	1000
$> 2 \times 10^7$	1500

注意:提取前, 需用细胞计数板或细胞计数仪得到细胞数量; 细胞数量低于 $1 \times 10^6$ 不建议使用本试剂盒。

3、加入②PS, PS:裂解液比例1:5, 剧烈震荡或涡旋10S;

4、13000rpm离心10min (室温离心), 离心后将上清转移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);

5、加入与上清等体积的③BGMG For RNA (使用前用力摇晃, 使磁珠均匀分散); 剧烈震荡或涡旋10S; 将装有混合物的离心管放置到磁力架或任何形式的磁场中, 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); 在磁场中倒去上清。

注意:离心管盖上有时会残留磁珠, 可通过颠倒磁力架, 使磁珠富集在一起;

6、加入④500μl RNA WB1(确认拆封时已加入无水乙醇), 脱离磁场, 剧烈震荡或涡旋10S(剧烈分散纳米磁珠, 否则将影响纯度); 将离心管再次放入磁力架或其他形式的磁场中, 静置10S(静置时间与所处磁场强度相关); 在磁场中倒去上清;

7、加入⑤500μl RNA WB2(确认拆封时已加入无水乙醇), 脱离磁场, 剧烈震荡或涡旋10S; 将离心管再次放入磁力架或其他形式的磁场中, 静置10S(静置时间与所处磁场强度相关); 在磁场中倒去上清;

8、重复步骤7;

9、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, 开离心管盖置于通风橱中让乙醇挥发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, 开离心管盖置于通风橱中让乙醇挥发10min;

9、加入适量⑥RNase-Free ddH<sub>2</sub>O (建议用量见下表), 剧烈震荡或涡旋10S使得磁珠完全重悬; 若有磁珠挂壁, 吸取离心管底部溶液滴到挂壁磁珠上, 用枪头将磁珠刮下;

磁珠溶液 (ul)	RNase-Free ddH <sub>2</sub> O (ul)
$X < 200$	$20 \geq X \geq 10$
$400 \geq X \geq 200$	$30 \geq X \geq 20$
$X > 400$	$40 \geq X \geq 30$

10、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 $\mu$ 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 ZJ 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 $^{\circ}$ C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。