



BGMG Cell Total RNADNA Kit

(细胞RNA/DNA共提取试剂盒)

CAT. NO. ZJ0065

产品说明:

本产品利用磁珠在特定缓冲液条件下可与核酸结合原理,在磁场作用下富集核酸;相较于柱子收集核酸,本产品提取核酸速度更快,最快可在35min内完成DNA/RNA的高质量共提取;本产品所提取核酸的A260/A280比值在1.85-2.10之间,提取后的RNA可直接用于反转录,DNA可用于转基因鉴定或基因片段扩增;本产品可用于多糖多酚样品核酸提取,且提取过程中无需氯仿,提取液中不含苯酚、β巯基乙醇;本产品操作更简便,操作过程中仅需离心一次。

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	ZJ0065
① ZJ DNA/RNA Extraction Lysis Buffer	100mL [#]
② BGMG For RNA	100mg [*]
③ DNA/RNA WB1	20mL ^{**}
④ DNA/RNA WB2	30mL ^{***}
⑤ DEPC-Treated ddH ₂ O	10mL

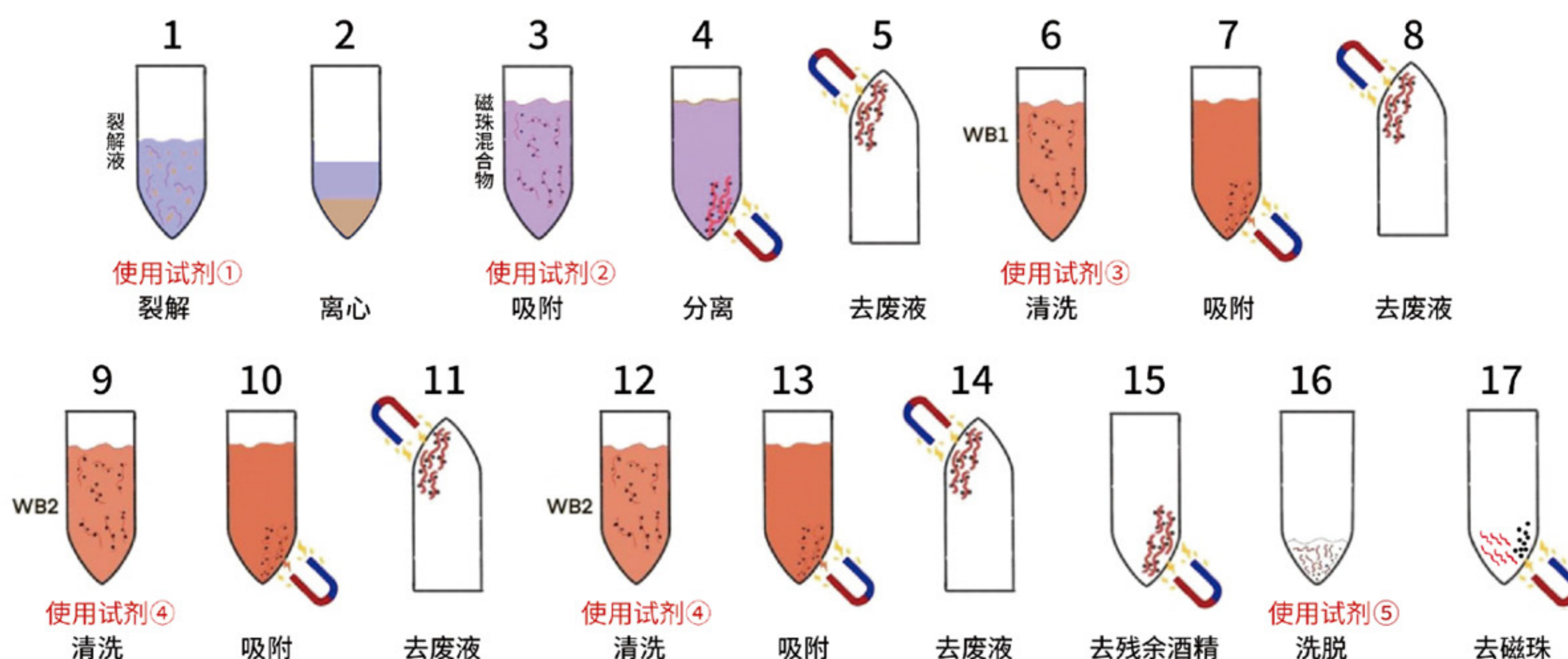
特别注意:

[#] ZJ DNA/RNA Extraction Lysis Buffer在温度较低的情况下会有盐离子析出,若溶液变浑浊,需预先在60°C水浴锅中加热融化;

^{*}使用前每100mg磁珠需加入100mL无水乙醇;^{**}使用前需加入30mL无水乙醇;^{***}使用前需加入70mL无水乙醇。

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.贴壁细胞除去培养基后用1ml① ZJ DNA/RNA Extraction 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 DNA/RNA Extraction Lysis Buffer,反复吹打或涡旋10S辅助破胞,常温静置5-10min;

注意:尽量采集足够的细胞,如果细胞数量极少(小于 10^5)不建议使用本产品。推荐12孔板,收集2孔细胞,6孔板收集1孔细胞(具体情况与细胞浓度有关,如100%贴壁细胞6孔板,收集单孔提取浓度约为450ng/ μ l);

2.13000rpm 离心5-10min (室温离心),离心后将上清约950 μ l转移到1.5ml或2ml RNase-Free 离心管中(如果样品中富含色素,会在上清中形成一团不能沉淀的絮状物质,色素在后期清洗中会除去,并不影响后续实验);

3.加入等体积的②BGMG For RNA (使用前用力摇晃,使磁珠均匀分散)(确认使用前已加入无水乙醇,上清:BGMG For RNA=1:1时,核酸吸附力最强);剧烈震荡或涡旋10S(剧烈分散纳米磁珠,否则将影响纯度),室温静置30S;

4.将装有混合物的离心管放置到磁力架上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);

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;

5.在磁场中倒去上清;

6.加入500 μ l③RNA WB1(确认使用前已加入无水乙醇),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);

7.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);

8.在磁场中倒去上清;

9.加入500 μ l④RNA WB2(确认使用前已加入无水乙醇),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);

10.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);

11.在磁场中倒去上清;

12.再次加入500 μ l④RNA WB2,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);

13.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);

14.在磁场中倒去上清;

15.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,并打开盖让乙醇挥发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,挥发酒精的时间与环境风速、温度、残余酒精量等参数相关,需要根据实际情况进行细微调节;

*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/DNA浓度(浓度过低)。乙醇清除程度过大(时间过久),会导致RNA/DNA被磁珠牢牢吸附,DEPC-Treated ddH₂O无法从磁珠上洗脱RNA/DNA;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。

16.加入50-100 μ l⑤DEPC-Treated ddH₂O处理水,剧烈震荡或涡旋10S使得磁珠完全重悬(细胞建议用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);

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

重要说明:

关于如何提高RNA/DNA的纯度与浓度

提高纯度的方法:

- a)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 DNA/RNA Extraction 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/DNA,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)对于粘性较大的样本,65 $^{\circ}$ C处理10min可提高核酸提取效率;
- d)可减少最终DEPC水体积。