

BT Cell Total RNA Kit 细胞总RNA提取试剂盒

使用说明书
Version 2.1

FOR RESEARCH USE ONLY

货号：S(50T) 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BT0065细胞RNA/DNA共提取试剂盒或BT0060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	S(50T)	L(100T)	试用装(5T)试用装已加无水乙醇
①BT RNAex Lysis Buffer (单独包装,货号BT0047)	50ml	100ml	5ml
②PS	10ml	20ml	1ml
③BT For RNA	0.5ml(50mg) [#]	1ml(100mg) [*]	4ml
④RNA WB1	12ml ^{##}	24ml ^{**}	3ml
⑤RNA WB2	16.5ml ^{###}	33ml ^{***}	5ml
⑥DEPC-Treated ddH ₂ O	3ml	6ml	1ml

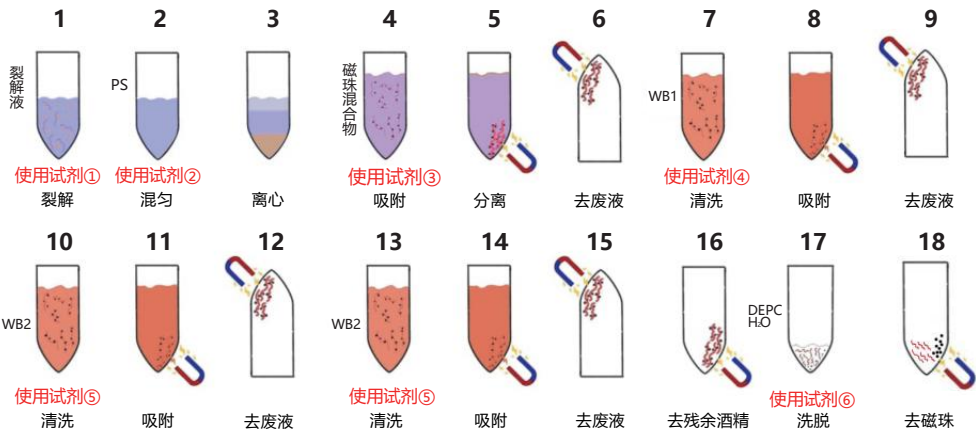
特别注意：

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;

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。

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

贴壁细胞除去培养基后用1ml①BT RNAex Lysis Buffer吹打10次使得细胞脱离培养基, 转移至1.5ml或2ml RNase-Free管中, 涡旋10S辅助破胞, 4℃静置5-10min;

悬浮细胞低速离心收集细胞, 弃上清后, 转移至1.5ml或2ml RNase-Free管中再加入1ml①BT RNAex Lysis Buffer, 反复吹打或涡旋10S辅助破胞, 4℃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10⁶)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/ul);

2. 加入200μl②PS剧烈震荡或涡旋10S;

3. 13000rpm 离心5-10min(室温离心), 离心后将上清约600μl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500μl上清);

4. 加入等体积的③BT 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: BT 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;

注意: 离心管盖上有可能会残留磁珠, 可通过颠倒磁力架, 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);

6. 在磁场中倒去上清;

7. 加入500μl④RNA 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);

8. 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);

9. 在磁场中倒去上清;

10. 加入500μl⑤RNA 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);

11. 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);

12. 在磁场中倒去上清;

13. 再次加入500μl⑤RNA 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);

14. 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);

15. 在磁场中倒去上清;

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25-50μl⑥DEPC-Treated ddH₂O处理水, 剧烈震荡或涡旋10S使得磁珠完全重悬(首选25μl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BT 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BT 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。

本试剂可适配全自动核酸提取仪,
详细操作见, AR0098通用版RNA自动化提取提取说明书。