

BT Stool RNA Kit 粪便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量显著高于柱子收集法；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

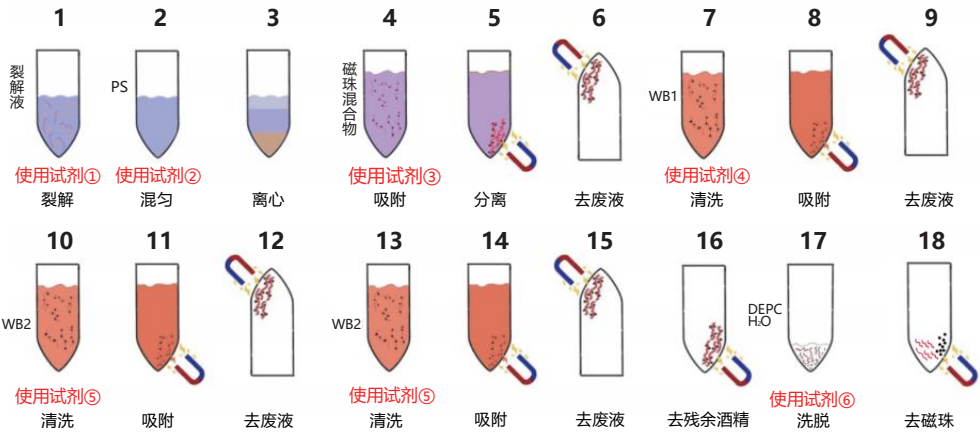
特别注意：

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

取适量粪便，加入①BT RNAex Lysis Buffer，65℃处理10min;

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: 离心管盖上有时会残留磁珠，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50-100μl⑥DEPC-Treated ddH₂ O处理水，剧烈震荡或涡旋10S使得磁珠完全重悬;

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。