

版本号: DP140916

RNAPrep Pure Blood Kit

RNAPrep Pure血液总RNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP433

产品内容

产品组成	DP433 (50 preps)
10×红细胞裂解液 (10× Red Cell Lysis Buffer)	60 ml
裂解液RL(Buffer RL)	30 ml
去蛋白液RW1(Buffer RW1)	40 ml
漂洗液RW(Buffer RW)	12 ml
RNase-Free ddH ₂ O (瓶装)	15 ml
RNase-Free吸附柱CR2 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR2 in a 2 ml Collection Tube)	50 套
RNase-Free过滤柱CS (含2 ml收集管) (RNase-Free Filtration Column CS in a 2 ml Collection Tube)	50 套
DNase I(1500 U)	1 支
缓冲液RDD(Buffer RDD)	4 ml
RNase-Free ddH ₂ O (管装)	1 ml
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5 ml)	50 个

储存条件

RNase-Free DNase I, 缓冲液RDD和RNase-Free ddH₂O(管装)置于2-8℃保存; 加入β-巯基乙醇的裂解液RL 4℃可放置一个月; 其他试剂室温(15-25℃)保存。

产品简介

本试剂盒可从血液中快速提取总RNA，可同时处理大量不同样品。提取的总RNA纯度高，没有蛋白和其它杂质的污染，可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆等多种下游实验。

预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在裂解液RL中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用RNase-Free ddH₂O。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(V/V)，混匀后放置过夜，高压灭菌。）

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 操作前在RL中加入β-巯基乙醇至终浓度1%，如1 ml RL中加入10 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RL 4℃可放置一个月，裂解液RL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
 2. 第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
 3. 人类的血液或体液可能有潜在的感染性，所以如果对人类的全血进行处理，请注意做好防护措施。
 4. 本试剂盒最多能处理1.5ml健康的人类全血（健康人的全血中白细胞含量为：最多4000-7000个白细胞/μl血液），如果血液中白细胞的含量较高，可按比例减少血液的用量，本试剂盒最多可处理的白细胞数量为：1×10⁷。
 5. 在白细胞裂解后，该说明书中的所有步骤需在室温（15-25℃）进行，操作速度越快越好。
 6. 细胞溶解物（在裂解液RL中）可以存放在-70℃，待使用时，将其置于37℃孵育10 min，以保证所有的盐都溶解，然后进行操作步骤第7步。
 7. 本试剂盒不适用于冻存的全血。
-

DNase I储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550 μ l RNase-Free ddH₂O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。

注意：从-20 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。

操作步骤

1. 红细胞裂解液的稀释：根据处理血液样品的体积选取适当体积的10 \times 红细胞裂解液（例如待处理的血液样品体积为200 μ l，则取140 μ l 10 \times 红细胞裂解液），用RNase-Free ddH₂O稀释至1 \times 红细胞裂解液。

2. 向1体积人类全血中加5倍体积1 \times 红细胞裂解液(需自备合适的干净管子)。

注意：为获得最佳的混匀效果，血液和1 \times 红细胞裂解液的混合液体积不应超过管子体积的3/4。如果血液中的白细胞含量较高，可按比例减小血液的使用体积，第6步中的裂解液RL的使用体积也要进行相应调整。

3. 在冰上孵育10-15 min，在孵育过程中涡旋振荡混匀2次。

注意：在孵育的过程中溶液将变成半透明状态，表明红细胞裂解。如果必要的话，孵育时间可延长至20 min。

4. 4 $^{\circ}$ C 2,100 rpm (~400 \times g)离心10 min，将上清完全去除。

注意：离心后白细胞可能会形成小球，确保完全去除上清，痕量红细胞的存在，会使白细胞小球呈现红色，而该现象会在随后的漂洗步骤中消失。

5. 向白细胞沉淀中加入1 \times 红细胞裂解液（加入1 \times 红细胞裂解液的体积是第1步中全血用量的2倍），重悬细胞。

6. 4 $^{\circ}$ C，2,100 rpm (~400 \times g)离心10 min，将上清完全去除。

注意：如果上清去除不完全将会影响裂解及随后的RNA与膜的结合，导致最后RNA产率降低。

7. 向白细胞沉淀中加入裂解液RL（使用前请加入 β -巯基乙醇），具体加量按照下表进行，涡旋或使用移液器混匀。

注：如果血液不是健康人的全血，需要根据血液中白细胞的数量来确定所需裂解液RL的体积，此时细胞应完全裂解，块状细胞沉淀消失。

裂解液RL(μ l)	健康人类全血(ml)	白细胞数量
350	多至0.5	多至 2×10^6
600	0.5-1.5	2×10^6 至 1×10^7

8. 将溶液转移至过滤柱CS中（过滤柱CS放在收集管中），12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，弃去过滤柱CS，收集滤液。

注意：为避免气溶胶的形成，请将移液器调整到≥750 μl以保证一次性将所有溶液转移到过滤柱上，如果细胞太多，将会出现裂解液粘稠的现象，造成难以吸取的情况。

9. 向滤液中加入1倍体积70%乙醇（通常为350 μl或600 μl），混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR2中（吸附柱CR2放入收集管中），12,000 rpm (~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

注意：配制70%乙醇时请使用RNase-Free ddH₂O，如果滤液体积有所损失，请相应减少70%乙醇用量。将溶液和沉淀转移至吸附柱CR2时，体积大于吸附柱容量，可以分两次完成。

10. 向吸附柱CR2中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

11. DNase I 工作液的配制：取10 μl DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀。

12. 向吸附柱CR2中央加入80 μl的DNase I 工作液，室温放置15 min。

13. 向吸附柱CR2中加入350 μl 去蛋白液RW1，12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

14. 向吸附柱CR2中加入500 μl漂洗液RW（**使用前请先检查是否已加入乙醇**），室温静置2 min，12,000 rpm(~13,400×g)离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

15. 重复步骤14。

16. 12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR2置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CR2在室温放置片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验。

17. 将吸附柱CR2转入一个新的RNase-Free离心管中，加入30-50 μl RNase-Free ddH₂O室温放置2 min，12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min，得到RNA溶液。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于30 μl，体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70℃保存。
