

版本号: DP140916

# RNA Lock Reagent

## RNA Lock 血液RNA稳定剂

目录号: DP440

### 产品内容

产品组成	DP440-01	DP440-02
血液RNA稳定剂 (RNA Lock Reagent)	20 ml	100 ml
悬浮液RSB(Buffer RSB)	5 ml	25 ml
Proteinase K	500 $\mu$ l	2 ml

### 储存条件

以上试剂均室温(15-25 $^{\circ}$ C)保存。

---

## 产品简介

血液RNA稳定剂是一种液态的、无毒的血液保存试剂。它能立即稳定新鲜血液中的RNA，含有该试剂的健康人全血样品可在2-8℃保存5天，或在-20℃或-70℃条件下至少保存三个月；含有该试剂的哺乳动物血液样品可在15-25℃保存2天，2-8℃保存7天，或在-20℃或-70℃条件下至少保存六个月，RNA不会出现明显降解。

如需纯化保存于血液RNA稳定剂的血液样品，请选择RNAprep Pure血液总RNA提取试剂盒（客户需另购，目录号：DP433）并结合本说明书中的优化流程进行操作。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。

## 提取得率参考

纯化保存于血液RNA稳定剂的血液样品时，使用RNAprep Pure血液总RNA提取试剂盒并结合本说明书中的优化流程提取的RNA得率如下：

材料	RNA得率
健康人全血（300 μl）	0.5–2 μg*
大鼠全血（100 μl）	2–6 μg
小鼠全血（100 μl）	4–8 μg

\*健康人全血的RNA产量高度依赖于供体，单次产量可能有所变动。

## 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。使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
  2. 玻璃器皿可在150℃烘烤4 h，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。
  3. 配制溶液应使用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O。（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。）
-

---

## 操作步骤

### I 血液样品保存:

- a. 使用前请确定血液RNA稳定剂储存于室温。取新鲜抗凝血液按1:3的比例加入血液RNA稳定剂（如取300  $\mu$ l健康人新鲜全血加入900  $\mu$ l血液RNA稳定剂或100  $\mu$ l哺乳动物新鲜血液加入300  $\mu$ l血液RNA稳定剂）。

**注意:** 保存血液样品时, 请立即在新鲜抗凝血液中加入3倍体积的血液RNA稳定剂。如需处理更大量的血液样本, 请选择合适规格的耗材进行操作。

- b. 立即盖上管盖, 上下颠倒混匀8-10次。含有血液RNA稳定剂的人血液样品可在2-8 $^{\circ}$ C保存5天, 或在-20 $^{\circ}$ C条件下至少保存三个月; 含有血液RNA稳定剂的哺乳动物血液样品可在15-25 $^{\circ}$ C保存2天, 2-8 $^{\circ}$ C保存7天, 或在-20 $^{\circ}$ C条件下至少保存六个月。

**注意:** 含有血液RNA稳定剂的血液样品必须在室温放置2 h以上, 以使血液样品充分裂解。该步骤可在低温保存样本前或完成保存之后进行。

### II 血液样品中RNA纯化:

**注意:** 如需纯化血液样品（保存于血液RNA稳定剂）中的RNA, 请选择RNAprep Pure血液总RNA提取试剂盒（客户需另购, 目录号: DP433）并按照以下流程进行操作。

1. 纯化保存于血液RNA稳定剂的血液样品时, 请先将样品室温放置或37 $^{\circ}$ C水浴使其升至室温。然后6,600 rpm (~4000 $\times$ g)离心10 min, 用移液器吸弃上清液, 取沉淀进行以下操作。
  2. 向沉淀中加入1 mL RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 用移液器吹打使沉淀完全溶解。
  3. 6,600 rpm (~4000 $\times$ g)离心10 min。用移液器吸弃上清液。

**注意:** 请将上清去除彻底, 否则会影响到RNA与CR2膜的结合。
  4. 缓慢加入240  $\mu$ l悬浮液RSB, 用移液器反复吹打使沉淀溶解完全。

**注意:** 该步骤沉淀较难溶解, 请吹打至沉淀完全溶解, 否则会降低RNA得率。
  5. 向溶解后的样品中加入200  $\mu$ l裂解液RL, 然后加入20  $\mu$ l Proteinase K溶液, 充分颠倒混匀, 55 $^{\circ}$ C孵育10 min, 其间颠倒混匀2-3次, 溶液应变清亮。

**注意:** 请不要预先将裂解液RL和Proteinase K溶液混合。如孵育后溶液未彻底变清亮, 请延长孵育时间至溶液清亮为止。
  6. 将所有溶液转移至过滤柱CS中(过滤柱CS放在收集管中), 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心3 min, 小心吸取收集管中的上清至新RNase-Free的离心管中, 吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。
-

- 
7. 加入0.5倍上清体积的无水乙醇(通常为220  $\mu\text{l}$ ), 混匀(此时可能会出现沉淀), 将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR2中, 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR2放回收集管中。
  8. 向吸附柱CR2中加入350  $\mu\text{l}$  去蛋白液RW1, 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心15-30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR2放回收集管中。
  9. DNase I 工作液的配制: 取10  $\mu\text{l}$  DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中, 加入70  $\mu\text{l}$  RDD溶液, 轻柔混匀。(DNase I储存液的配制: 将DNase I干粉(1500 U)溶解在550  $\mu\text{l}$  RNase-Free ddH<sub>2</sub>O中, 轻柔混匀, 分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存(可保存9个月)。

**注意: 解冻后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}\text{C}$ (可保存6周), 避免反复冻融。**

10. 向吸附柱CR2中央加入80  $\mu\text{l}$ 的DNase I 工作液, 室温放置15 min。
11. 向吸附柱CR2中加入350  $\mu\text{l}$  去蛋白液RW1, 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心15-30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR2放回收集管中。
12. 向吸附柱CR2中加入500  $\mu\text{l}$ 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( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR2放回收集管中。
13. 重复步骤12。
14. 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min, 倒掉废液。将吸附柱CR2置于室温放置3 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
15. 将吸附柱CR2转入一个新的RNase-Free离心管中, 加入30-50  $\mu\text{l}$  RNase-Free ddH<sub>2</sub>O室温放置2 min, 12,000 rpm( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min, 得到RNA溶液。

**注意: 洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu\text{l}$ , 体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。**

### III 血液样品中基因组DNA纯化:

**如需纯化血液样品(保存于血液RNA稳定剂)中的基因组DNA, 请向Tiangen公司索取实验操作流程。**

---