

SteadyPure 血液RNA提取试剂盒

SteadyPure Blood RNA Extraction Kit

Code No. AG21025

包装量: 50 rxns
保存温度: Package 2-1 -20°C
 Package 2-2 室温 (15-25°C)

产品概述

本制品是提取哺乳动物新鲜血液或冻存血液中总RNA的试剂盒，可处理多种抗凝剂的血液样品。试剂盒采用独特的裂解系统，无需有毒的酚氯仿抽提，能在迅速裂解血液细胞的同时抑制细胞释放出的核酸酶，保持RNA的完整性。利用10X RCL Buffer 裂解红细胞，收集获得白细胞，收集获得的白细胞经裂解后再通过*Blood RNA* Mini Column 获得高纯度、高收量的RNA。纯化获得的Total RNA可以直接用于Northern 杂交、mRNA纯化、体外翻译、RT-PCR、RT-qPCR等各种分子生物学实验。如果有需要，可使用DNase I (Code No. AG12001) 处理Total RNA 以除去含有的DNA。

安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂，实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套，然后再进行实验操作。

注意：使用后溶液需要收集在废液桶中专门处理。

如果Buffer BLS、Buffer RWA 不小心溅出，请立刻用大量清水冲洗，然后用浓度为 1% 的次氯酸钠溶液清洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

产品组成

50X DTT Solution ^{*1}	700 μl
10X RCL Buffer	80 ml
Buffer BLS	30 ml
Buffer RWA	30 ml
Buffer RWB ^{*2}	27 ml
RNase Free Water ^{*3}	13 ml
<i>Blood RNA</i> Mini Columns	50 sets
Collection tubes	50 pcs
RNase Free Tubes ^{*4}	50 pcs

*1 此组分包装于Package 2-1中，需放置于-20°C保存；其余组分均包装于Package 2-2 中，室温(15-25°C) 保存。

*2 Buffer RWB 在首次使用前，请添加 63 ml 的 100%乙醇 (Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7)，混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。

*3 开启后建议保存于-20°C。此组分仅用于洗脱RNA，稀释10X RCL Buffer 用的无核酸酶水需自备。

*4 此组分仅用于洗脱RNA，前期裂解所用离心管需自备。

实验前准备

1. 自备：无核酸酶水、无水乙醇、70%乙醇、1.5 ml 离心管 (RNase free)、15 ml或50 ml离心管 (用于红细胞裂解)。
2. Buffer BLS 若出现沉淀，请于 60°C 加热溶解，待溶液恢复至室温后使用。
3. Buffer RWB 在首次使用前，请添加 63 ml 的 100% 乙醇 (Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7)，混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。
4. Buffer BLS 使用前需加入 50X DTT Solution，至终浓度为1X DTT Solution，即每1 ml 的Buffer BLS 中加入 20 μl 的50X DTT Solution。此裂解 Buffer 最好现配现用。加入50X DTT Solution 的 Buffer BLS 可在室温放置 1个月。

保存及运输

保存温度: Package 2-1 -20°C 保存；
 Package 2-2 室温 (15-25°C) 保存。

运输温度: Package 2-1 干冰或-20°C冰袋运输；
 Package 2-2 室温运输。

► 注意事项

1. 本试剂盒可从新鲜血液或冻存血液中有效提取总RNA。冻融过程中会引起血液中细胞破裂，导致RNA降解。因此，为了获得高质量的RNA，应尽量使用新鲜的血液。
2. 长时间放置会导致血液中RNA不同程度的降解，因此，新鲜血液采集后请放置于冰上或2~8℃，尽快进行提取（最好2h内进行提取，建议不超过4h）。
3. 若新鲜血液无法在短时间内提取，可按照以下几种方法保存：
 - a) 按本说明书中“红细胞裂解”步骤分离获得白细胞，将白细胞直接置于-80℃长期保存。保存的白细胞可继续按照说明书中“白细胞裂解”步骤开始RNA提取。
 - b) 购买商品化血液RNA保护剂，按照血液RNA保护剂的说明书方法保存血液。
 - c) 血液可直接置于-80℃短暂保存3天左右，后续按照此说明书进行提取；但血液冻存后，RNA会存在不同程度的降解，导致提取获得的RNA质量较差。
4. 肝素抗凝剂对DNA聚合酶有抑制作用，应尽量避免使用肝素抗凝剂。
5. 裂解的白细胞数量最好不要超过最大起始量，且要充分裂解，以免堵塞Mini Column，影响RNA收量及纯度，上样量及裂解液使用量参考Table 1。如果样本量较大，请适当增加裂解液Buffer BLS用量。
6. *Blood RNA* Mini Column的最大容积为700 μl，使用时如果液体的体积超出最大容积，分次加入：上样700 μl裂解液后，离心，去滤液然后将剩余裂解液再次上样，重复此步骤。或使用多个Mini Columns进行纯化操作。
7. 操作过程中，应预防RNase污染，需注意以下几方面：
 - a) 使用RNA操作专用实验台，经常更换新手套，穿戴RNA专用实验服，实验过程中尽量不要说话及来回走动，操作过程中避免物品从离心管上方过。
 - b) 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的RNase污染。
 - c) 使用无核酸酶的水准确配制70%的乙醇溶液，同时，确保配制好的70%乙醇无核酸酶污染。
 - d) 使用无核酸酶的水稀释10X RCL Buffer。

► Buffer BLS 推荐使用量

本产品单次可处理小于1.5 ml的健康人体血液样品，1 ml健康人体血液中含有4.0E+06 ~ 7.0E+06个白细胞。如果血液不是健康人体的血液，需要根据血液中白细胞的数量来确定所需裂解液BLS的体积（如果是其他哺乳动物血液，需要根据白细胞数量，估算血液上样量）。样本量过多会导致裂解不充分、DNA消化不完全（可选步骤DNase I消化）、堵塞纯化柱等问题，最终导致RNA的收量及纯度降低。实验前请参考Table 1中样本推荐起始量和推荐Buffer BLS的使用量。

Table. 1 样本推荐起始量和推荐Buffer BLS 的使用量

健康人类血液	推荐 Buffer BLS 使用量	白细胞数量
≤0.5 ml	350 μl	≤3.5E+06
0.5~1.5 ml	600 μl	3.5E+06 ~ 1.0E+07

► 操作流程简图



操作流程

裂解步骤:

红细胞裂解:

1. 根据需处理的血液样品体积量取适当体积的 10X RCL Buffer，用无核酸酶水稀释至 1X RCL Buffer 备用（例：需要处理的血液量为 500 μ l，则可取 350 μ l 的 10X RCL Buffer 与 3150 μ l 的无核酸酶水混匀）。
2. 向适量的血液样本中加入 5 倍血液体积的 1X RCL Buffer，轻柔颠倒混匀 5~10 次，使溶液充分混匀。
(注：为获得最佳混匀效果，血液和 1X RCL Buffer 的混合体积不应超过容器体积的 3/4，便于混匀充分。)
3. 冰上放置 10~20 min，放置过程中混匀 2 次（每次轻柔颠倒 5~10 次，使溶液充分混匀）。
(注：若裂解不充分，放置时间可延长。)
4. 400 xg 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟，小心地将上清完全去除。
5. 向上述白细胞沉淀中加入 2 倍血液体积的 1X RCL Buffer 轻柔吹打混匀重悬沉淀。
6. 400 xg 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟，小心地将上清完全去除。
(注：若上清去除不完全会影响 RNA 的纯度；此步骤收集的白细胞沉淀可直接保存于 -80 $^{\circ}$ C，冻存后的白细胞可按后续操作步骤进行 RNA 提取。)



红细胞的裂解处理

白细胞裂解:

1. 向白细胞沉淀中加入适量裂解液 Buffer BLS（按 Table 1 中推荐的使用量，且在使用前确认 Buffer BLS 中已加入 50X DTT Solution），立即高速涡旋混匀或用移液枪反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。
(注：若裂解匀浆比较粘稠，可使用小号注射器抽打裂解液 5~10 次打断 DNA。)
2. 裂解液室温静置 2 分钟。



白细胞裂解处理

纯化步骤:

1. 向上述裂解液中加入等体积的 70% 乙醇，用移液枪吹打混匀，若出现明显粘稠物或沉淀，用移液枪吹打多次，打散沉淀。
(注：若沉淀不散会导致 Blood RNA Mini Column 堵塞，影响收量及纯度。)
2. 立即将上述混合液和沉淀全部转移至 Blood RNA Mini Column 中，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
3. 向 Blood RNA Mini Column 中加入 600 μ l 的 Buffer RWA，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
4. 向 Blood RNA Mini Column 中加入 650 μ l 的 Buffer RWB，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
(注：请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100% 乙醇。)
5. DNA 酶消化步骤：此步骤为可选步骤，如果对 gDNA 去除效果有更高要求，可进行此步骤，按照附录“可选步骤”进行。如不需要，请按照下述步骤 6 继续进行。
6. 向 Blood RNA Mini Column 中加入 650 μ l 的 Buffer RWB，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
7. 将 Blood RNA Mini Column 的吸附柱安置于新的 2.0 ml Collection Tube 上，12,000 rpm 室温离心 2 分钟。
(注：此步骤需竖直将吸附柱取出，避免吸附柱柱头触碰收集管壁；安装于新的 2.0 ml Collection Tube 上有利于提高 RNA 纯度。)
8. 将 Blood RNA Mini Column 的吸附柱安置于新的 RNase Free Tube 上，在吸附柱膜的中央处加入 30 μ l - 50 μ l RNase Free Water，室温静置 5 分钟，然后 12,000 rpm 室温离心 2 分钟洗脱 RNA，将溶解后的 RNA 放入 -80 $^{\circ}$ C 中保存。



Blood RNA Mini Column 吸附 RNA
600 μ l Buffer RWA 洗 1 次



650 μ l Buffer RWB 洗 2 次
空管离心 2 分钟



30 μ l - 50 μ l
RNase Free Water 洗脱



➤ 操作流程

可选步骤：DNase I 消化：

- ① 按下表配制 DNase I 反应液并混匀。把50 μl DNase I 反应液加到*Blood RNA* Mini Column的膜中央，室温静置15分钟。

成分	用量
DNase I (RNase free)	4 μl
10X DNase I Buffer	5 μl
RNase free water	41 μl

- ② 向上述*Blood RNA* Mini Column 膜中央加入350 μl Buffer RWB，12,000 rpm室温离心 1分钟，弃滤液。
- ③ 后续实验，请按照上述纯化步骤 6-8 操作。