

版本号: RP151208

RNAprep Pure Hi-Blood Kit

RNAprep Pure 高效血液总RNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP443

产品内容

产品组成	DP443 (50 preps)
10 × 红细胞裂解液H (10 × Red cell Lysis Buffer H)	60 ml
裂解液RLH (Buffer RLH)	30 ml
去蛋白液RW1H (Buffer RW1H)	24 ml
漂洗液RW (Buffer RW)	12 ml
RNase-Free ddH ₂ O (瓶装)	15 ml
RNase-Free吸附柱CR4 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR4 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

加入β-巯基乙醇的裂解液RLH 4℃可放置一个月; DNaseI, 缓冲液RDD, 2-8℃保存; 其他试剂室温 (15-25℃) 保存。

产品简介

本试剂盒可从新鲜全血中高效提取总RNA，可处理不同物种以及多种抗凝剂全血样品。吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，高效、专一吸附RNA，可最大限度去除杂质蛋白。提取的RNA可用于RT-PCR、Real Time RT-PCR、芯片分析、高通量测序、Northern Blot、Dot Blot、Poly A 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RLH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°C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。
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RLH中加入β-巯基乙醇至终浓度1%，如1 ml RLH中加入10 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLH 4 °C可放置一个月，裂解液RLH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与去蛋白液RW1H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1.5 ml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°C)进行，操作速度越快越好。
 6. 细胞溶解物(在裂解液RLH中)可以存放在-70°C，待使用时，将其置于37°C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 μl RNase-Free ddH₂O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存(可保存9个月)。(如果需要DNase I，可以询问TIANGEN公司)

注意：从-20 $^{\circ}\text{C}$ 融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}\text{C}$ (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H (例如待处理的血液样品体积为200 μl ，则取140 μl 10 \times 红细胞裂解液H)，用RNase-Free ddH₂O稀释至1 \times 红细胞裂解液H。

2. 向1体积人类全血中加5倍体积1 \times 红细胞裂解液H (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H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1 \times 红细胞裂解液H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 $^{\circ}\text{C}$ 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H (加入1 \times 红细胞裂解液H的体积是第1步中全血用量的2倍)，重悬细胞。

6. 4 $^{\circ}\text{C}$ ，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RLH (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RLH的体积，此时细胞应完全裂解，块状细胞沉淀消失。

裂解液RLH (μl)	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

-
- 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≥750μl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。

- 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CR4中(吸附柱CR4放入收集管中), 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心30-60sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR4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CR4时, 体积大于吸附柱容量, 可以分两次完成。

- 如果不进行DNase I消化, 可以直接向吸附柱CR4中加入700μl 去蛋白液RW1H (使用前请先检查是否已加入乙醇), 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 直接进行步骤14。

DNase I消化: 向吸附柱CR4中加入350 μl 去蛋白液RW1H, 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR4放回收集管中。

- 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。

- 向吸附柱CR4中央加入80 μl的DNase I工作液, 室温放置15 min。

- 向吸附柱CR4中加入350 μl 去蛋白液RW1H, 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CR4放回收集管中。

- 向吸附柱CR4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CR4放回收集管中。

- 重复步骤14。

- 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心2 min, 倒掉废液。将吸附柱CR4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: 离心后将吸附柱CR4在室温放置片刻, 以充分晾干。如果有漂洗液残留, 可能会影响后续的反转录, 荧光定量等实验。

- 将吸附柱CR4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。
