



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ **HiFi 全血 RNA 快速提取试剂盒**
- ◆ **目录号 1106**
- ◆ **使用手册**
- ◆ **实验室使用，仅用于体外**

HiFi 全血 RNA 快速提取试剂盒

目录号: 1106

目录编号	包装单位
110601	20次
110602	50次

❖ **适用范围:**

适用于快速提取全血总RNA

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	20 次	50 次
10X 红细胞裂解液 RLB	室温	10 ml	25 ml
裂解液 RLT	室温	20 ml	50 ml
去蛋白液 RW1	室温	15 ml	40 ml
漂洗液 RW	室温	5 ml	10 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	10 ml
70%乙醇	室温	4ml RNase-free H ₂ O	9ml RNase-free H ₂ O
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	20 套	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温 (4°C 或者 -20°C) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果, 因此运输和储存均在室温下 (15°C-25°C) 进行。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ **产品介绍:**

红细胞裂解液选择性裂解红细胞, 然后独特的裂解液/ β -巯基乙醇迅速裂解白细胞和灭活细胞 RNA 酶, 然后用乙醇调节结合条件后, RNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物, 蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase free H2O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。


❖ **产品特点:**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 反复优化的红细胞裂解液配方, 裂解效果快速完全。
4. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 40 分钟内完成。
5. 多次柱漂洗确保高纯度, OD_{260}/OD_{280} 典型的比值达 1.9~2.0, 基本无 DNA 残留, 可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

❖ **注意事项**

1. **第一次使用前请先在漂洗液RW瓶和70%乙醇瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！**
2. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
3. 需要自备乙醇, β -巯基乙醇, 一次性注射器, 研钵。
4. **裂解液RLT 和去蛋白液RW1中含有刺激性化合物**，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
5. 预防RNase 污染，应注意以下几方面：
 - 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。
 - RNA 在裂解液 RLT 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 4 小时，塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。
 - 配制溶液应使用无 RNase 的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v)，37℃放置过夜，高压灭菌。）
6. 关于DNA 的微量残留：

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留,本公司的 HiFi 系列 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和选择了特殊吸附能力的吸附膜，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留（一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见）影响不是很大，如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR,我们建议在进行模板和引物的选择时：

-
- 
- 选用跨内含子的引物,以穿过 mRNA 中的连接区,这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
 - 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
 - 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁(cleanup),请联系我们索取具体操作说明书。
 - 在步骤去蛋白液 RW1 漂洗前,直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 处理。请联系我们索取具体操作说明书。

7. RNA 纯度及浓度检测:

完整性: RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件: 胶浓度 1.2%; 0.5×TBE 电泳缓冲液; 150v, 15 分钟)检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA, 电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。动物 rRNA 大小分别约为 5 kb 和 2kb, 分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍, 否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度: OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA, OD260/OD280 读数 (10mM Tris, pH7.5) 在 1.8-2.1 之间。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品, 假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280 读数 1.8-2.1 之间, 在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间, 但这并不表示 RNA 不纯。

浓度: 取一定量的 RNA 提取物, 用 RNase-free 水稀释 n 倍, 用 RNase-free 水将分光光度计调零, 取稀释液进行 OD260, OD280 测定, 按照以下公式进行 RNA 浓度的计算: 终浓度 (ng/μl) = (OD260)×稀释倍数 n)×40

❖ **操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

提示：

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇!
- ⇒ 使用前将 10X 红细胞裂解液 RLB 用 DEPC 处理水稀释到 1X。
- ⇒ 操作前在裂解液 RLT 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml RLT 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT 4 $^{\circ}$ C可放置一个月。

1. 在适合大小的 RNase free 离心管中加入 1 体积 (<1.5 ml) 加入各种抗凝剂新鲜血液（颠倒混匀后）和 3 体积的红细胞裂解液 RLB,颠倒混匀,可轻弹管壁,确保混匀。
2. 室温放置 10 分钟（期间应该颠倒轻弹混匀数次帮助裂解红细胞）。

如果 RNA 降解严重,可在冰上裂解,但是时间可长一些以充分裂解。

3. 12,000 rpm 离心 20 秒，倒弃红色上清，并小心的尽可能多的吸弃上清（注意不要吸到管底的细胞团），留下完整的管底白细胞团。

离心后在管底应该见到白色的白细胞团，也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起，但是如果看到的是大部分的红色细胞团，说明红细胞裂解很不充分，应该再加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复步骤 2，3。

上清尽可能的吸弃,残留过多会稀释裂解液,造成裂解结合异常,产量纯度降低。

4. 涡旋或者轻弹管壁将白细胞沉淀完全松散重悬，加入 350 μ l (<0.5 ml 全血) 或者 600 μ l (0.5-1.5ml 全血) 裂解液 RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。**病人血样中白细胞数量可能大幅增加,应该适当减少处理量。或者按照 350 μ l (<2 \times 10 6 白细胞) 或者 600 μ l (2 \times 10 6 -1 \times 10 7 白细胞) 比例加 RTL。**

5. 用带钝针头的一次性 1 ml(配 0.9mm 针头) 注射器抽打裂解物 5-10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒),可以剪切 DNA,降低粘稠度和提高产量。
6. 较精确估计裂解物体积,加入等体积的 70%乙醇(请先检查是否已加入无水乙醇!),

此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程,立即吹打混匀,不要离心。

7. 立刻将混合物(每次小于 700 μ l,多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中,(吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 60 秒,弃掉废液。
8. 加 700 μ l 去蛋白液 RW1,室温放置 30 秒,12,000rpm 离心 30 秒,弃掉废液。

如果 DNA 残留明显,可在加入 RW1 后室温放置 5 分钟再离心。

9. 加入 500 μ l 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!),12,000 rpm 离心 30 秒,弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW,重复一遍。
10. 将吸附柱 RA 放回空收集管中,13,000 rpm 离心 2 分钟,尽量除去漂洗液,以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 取出吸附柱 RA,放入一个 RNase free 离心管中,根据预期 RNA 产量**在吸附膜的中间部位**加 30-50 μ l RNase free water(事先在 70-80 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好),室温放置 1 分钟,12,000 rpm 离心 1 分钟。
12. 如果提取全血>0.5 ml 或者>2x10⁶ 白细胞,加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 11,合并两次洗脱液,或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高,分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%,但是浓度要低,用户根据需要选择。