

EASYspin 全血 RNA 快速提取试剂盒

EASYspin RNA Rapid Blood Kit



产品信息:

试剂盒组成	保存	RA104-01 50 次
10×RLB (RNase free)	室温	25ml
裂解液 RLT	室温	50ml
去蛋白液 RW1	室温	40ml
漂洗液 RW	室温	10ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
DNaseI	-20℃	500μl
缓冲液 RDD	-20℃	1ml×4
RNase-free H ₂ O	室温	10ml
70%乙醇	室温	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	室温	50 个
收集管	室温	50 个
RNase-free 离心管 1.5ml	室温	50 个

保存条件: 本试剂盒在规定保存温度储存 12 个月不影响使用效果。

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 在高离序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 RNA 从硅基质膜上洗脱。

自备试剂: 乙醇, β-巯基乙醇

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.需要自备一次性注射器。

3.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。**

4.关于DNA的微量残留：

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,我们建议在模板和引物的选择时：

(1)选用跨内含子的引物,这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。

(2)选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。

5.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 min）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 5kb 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：

⇒ 使用前将 10×RLB (RNase free) 用 DEPC 处理水稀释到 1×。

⇒ 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 10μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT 4℃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 1×RLB (RNase free)，颠倒混匀,可轻弹管壁,确保混匀。

2.室温放置 10min（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。

3.12,000rpm 离心 20 sec，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。如发现红细胞大量残留可重复 2，3

步骤。

4. 涡旋或者轻弹管壁将白细胞沉淀完全松散重悬，加 350 μ l (<0.5 ml 全血或 $<2 \times 10^6$ 白细胞) 或者 600 μ l (0.5-1.5ml 全血或 2×10^6 - 1×10^7 白细胞) 裂解液 RLT，吹打混匀后用手剧烈振荡 20 sec，充分裂解。
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 sec), 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. 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) 12,000rpm 离心 30-60 sec, 弃掉废液。
8. 加 350 μ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 sec, 12, 000rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。将吸附柱 RA 放回收集管中。
9. DNaseI 工作液的配制: 取 10 μ l DNaseI 储存液放入新的 RNase-free 离心管中, 加入 70 μ l RDD 溶液, 轻柔混匀。
10. 向吸附柱 RA 中央加入 80 μ l DNaseI 工作液, 室温放置 15 min (一般情况下室温放置可得到较好的消化效果, 如果室温效果不佳可选择在 37 $^{\circ}$ C 放置 15 min)。
11. 加 350 μ l 去蛋白液 RW1, 室温放置 30 sec, 12, 000rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。将吸附柱 RA 放回收集管中。
12. 加入 500 μ l 漂洗液 RW (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 RW, 重复一遍。
13. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000rpm 离心 2 min, 将吸附柱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。
14. 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 (事先可在 65 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 1 min, 12,000rpm 离心 1 min。
15. 如果提取全血 >0.5 ml 或者 $>2 \times 10^6$ 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。