

操作手册

血液总 RNA 提取试剂盒

Catalog No. TR121-50 (50 次反应)

TR121-50N (50 次反应不带 DNaseI)

Highlights

- 适用于从全血或血液样品沉淀的细胞中提取总 RNA (含 microRNA)。
- 兼容各种抗凝剂的血液 (EDTA, 肝素, 柠檬酸等)。
- 无 DNA 的 RNA 可应用于各种下游实验。(需使用 DNase I)
- 试剂盒内提供的 DNA/RNA 保护剂 可有效防止 RNA 降解并且可常温运输血液样品。

Ver.1.0.8

产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次
DNA/RNA 保护剂	室温	50 ml
RNA 回收液	室温	16 ml
RNA 预洗液	室温	25 ml
RNA 洗涤液	室温	24 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	4 ml
DNase I	-20°C	250U X 1 管
DNA 消化液	室温	4 ml
PK 消化液	室温	5 ml
蛋白酶 K 及保存液	-20°C	20 mg X 2
1 号柱	室温	50 个
3 号柱 G	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个 X 2 包

特性:

1. 样品来源: 1ml以内的全血 (新鲜或者保存在DNA/RNA保护剂中的血液), 血清或者血浆, 同时也可提取血液细胞沉淀 (PBMC,WBC,血黄层)。
2. 样品保存: DNA/RNA保护剂可有效裂解细胞, 灭活核酸酶和各种病毒, 对于常温下安全运输样品是最佳方案。
3. RNA大小: ≥ 17 核苷酸。
4. RNA纯度: 高质量的RNA可应用于高通量测序等敏感的下游实验, 需配合试剂盒内的DNase I来完全去除DNA。
5. RNA回收率: 可从1ml血液中回收到2-10 μ g的RNA. (根据个体和物种的区别会有所不同)。
6. 所需设备: 台式离心机和涡旋仪。

试剂制备

RNA 洗涤液 在使用之前一定要配好，添加好乙醇后在试剂瓶上做好标记!!!
需要添加 96ml100%的乙醇（或 104ml95%乙醇）到 24ml 的 **RNA 洗涤液** 中。

溶解冻干粉状态的DNase I需要按照管子上的量添加 RNase-free H₂O
一般250U的DNase I 需要添加275μl的RNase-free H₂O，之后放于-20℃保存。

使用前需要添加1060μl保存液到20mg蛋白酶K里，蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml，混合之后需要放到-20℃保存。

操作步骤:

以下离心步骤的离心力均在10,000-16,000 x g 时间30秒，除非特殊说明。

RNA提取步骤（针对哺乳动物全血）

1. 添加200μl DNA/RNA 保护剂到200μl全血样品中并且混匀。
2. 添加8μl蛋白酶K并且混匀。在室温下(20-30℃)孵育30分钟。

如血液样品大于200μl则需要等比例调整DNA/RNA 保护剂和蛋白酶K的用量。
3. 添加等体积的异丙醇并且涡旋混匀。
4. 将混匀的样品添加到3号柱G中并且套在收集管内离心，将3号柱G转移到一个干净的RNase-free离心管中（不提供）。
5. 添加200μl的RNA回收液到3号柱G里，离心。
6. 添加200μl乙醇（95-100%）到上一步（步骤5）的滤出液中混匀。
7. 将混合物添加到1号柱C中，并且套在一个收集管内，离心，倒掉滤出液。

8. 柱上DNase I消化处理（推荐），此步骤主要是为了去除痕量的DNA。
 - a) 添加400μl的RNA洗涤液到1号柱子C里，离心,去除滤出液。
 - b)对于每一次的样品处理需要制备40μl的DNase I反应液。配比为 DNase I 5μl DNA消化液 35μl
 - c)直接添加40μl的DNase I反应液到1号柱上，在室温下（20-30℃）孵育15分钟。
9. 添加400μl的RNA预洗液到1号柱子里，离心，去除滤出液。
10. 添加700μl的RNA洗涤液到1号柱子里，离心，去除滤出液。
- 11.添加400μl的RNA洗涤液到1号柱子里，离心，去除滤出液。
12. 空转2分钟以去除残留的乙醇，以免抑制下游反应。
13. 取出1号柱，放入一个无RNA酶的离心管中，在吸附膜的中间部位加15μl RNase-free water（事先在 65-70℃水浴中加热效果更好），室温放置2分钟，离心1分钟洗脱RNA。

RNA提取步骤（针对血液细胞沉淀）

此步骤兼容血液细胞沉淀，包括 PBMC,WBC(例如用RBC裂解后的样品)，血黄层。操作之前需先将 2X DNA/RNA 保护剂用无核酸酶的水稀释到1X

1. 添加300μl 1X DNA/RNA 保护剂到沉淀的样品中重悬。
2. 添加30μl PK消化液和15μl蛋白酶K到样品中混匀。在55℃下孵育30分钟。
3. 孵育之后，涡旋样品并且最大速离心2分钟来沉淀细胞。将水相上清转移到一个干净的RNase-free离心管中（不提供）。
4. 添加1体积的RNA回收液到离心管中混匀。
5. 将混匀的样品添加到3号柱G中并且套在收集管内离心。保留滤出液。
6. 添加1体积的乙醇（95-100%）到上一步（步骤5）的滤出液中混匀。
7. 将混合物添加到1号柱C中，并且套在一个收集管内，离心，倒掉滤出液。

8. 柱上DNase I消化处理（推荐），此步骤主要是为了去除痕量的DNA。
 - a) 添加400μl的RNA洗涤液到1号柱子C里，离心,去除滤出液。
 - b)对于每一次的样品处理需要制备40μl的DNase I反应液。配比为 DNase I 5μl DNA消化液 35μl
 - c)直接添加40μl的DNase I反应液到1号柱上，在室温下（20-30℃）孵育15分钟。
9. 添加400μl的RNA预洗液到1号柱子里，离心，去除滤出液。
10. 添加700μl的RNA洗涤液到1号柱子里，离心1，去除滤出液。
- 11.添加400μl的RNA洗涤液到1号柱子里，离心，去除滤出液。
12. 空转2分钟以去除残留的乙醇，以免抑制下游反应。
13. 取出1号柱，放入一个无RNA酶的离心管中，在吸附膜的中间部位加15μl RNase-free water（事先在 65-70℃水浴中加热效果更好），室温放置2分钟，离心1分钟洗脱RNA。